



Daniel Vieira Alves Luís

Licenciado

**Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos
organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Professora
Doutora, FCT/UNL

Co-orientadora: Susana Isabel Rodrigues dos Santos, Professora Doutora, IST/UTL

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Paulo Sampaio

Arguente: Professor Doutor António Sebastião Rodrigues

Vogal: Professora Doutora Alexandra Fernandes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Daniel Vieira Alves Luís

**Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos
organometálicos contendo 1,10-fenantrolina-5,6-diona**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Professora Doutora Alexandra Fernandes (FCT/UNL)

Co-orientadora:

Professora Doutora Susana Santos (IST/UTL)

LISBOA

2011

Caracterização do efeito anti-tumoral de complexos organometálicos contendo 1,10- fenantrolina-5,6-diona

Copyright Daniel Luís, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Alexandra Fernandes agradeço a oportunidade que me concedeu, bem como a confiança que depositou em mim e a aceitação das ideias que surgiram ao longo do projecto. Agradeço sinceramente todo o apoio que me deu para que pudesse realizar o meu trabalho, bem como o seu incansável esforço e o tempo dispendido com a revisão deste trabalho.

À Professora Doutora Susana Santos agradeço o empenho e disponibilidade que demonstrou ao longo deste projecto, bem como a motivação transmitida e todo o trabalho que teve com a revisão desta tese.

À Prof. Doutora Cecília Rodrigues, do Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed) da Faculdade de Farmácia, da Universidade de Lisboa, pela parceria que me permitiu adquirir todos os conhecimentos no manuseamento de linhas tumorais.

À Prof. Doutora Paula Videira da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa, por conceder a oportunidade de colaboração da qual tanto beneficiou este trabalho e a minha experiência científica.

À Prof. Doutora Guadalupe Cabral da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa, pela disponibilidade e simpatia com que me recebeu e pelo valioso contributo na análise dos resultados de citometria de fluxo.

À Doutora Tânia Simões, do Grupo de Investigação da Prof. Doutora Débora Penque, do Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética do INSA-IP pela disponibilidade e excelência na análise das proteínas por mim enviadas.

Ao Prof. António Sebastião Rodrigues gostaria de expressar a minha gratidão pela colaboração que permitiu alargar a minha experiência científica e pela simpatia e disponibilidade que demonstrou na partilha do seu conhecimento.

Ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico pela cedência do composto utilizado neste trabalho e de toda a informação por mim solicitada.

Aos meus colegas, Ana Silva, Ana Sousa, Helena, Kelly, Leonor, Luís, Marina e Vanda, pela sua amizade e companheirismo, e sobretudo pela alegria transmitida todos os dias. À Ana Silva agradeço particularmente toda a iniciativa, paciência e motivação que demonstrou ao longo dos ensaios realizados em conjunto.

Agradeço à Linda, à Nuvelan, à Janete, à Ana Rita e à Carina a amizade e alegria partilhadas ao longo de todo o meu percurso académico, tornando os dias mais alegres e emocionantes.

À Cláudia e ao Vasco por todo o apoio, paciência e grande amizade que sempre demonstraram, independente da situação ou da ocasião, tornando a minha pequena família um pouco maior.

Aos meus avós o apoio constante que sempre me deram e o orgulho que sempre demonstraram por mim.

À minha mãe e à minha irmã agradeço toda a confiança, amor e alegria sempre presentes e o facto de até nas minhas falhas verem potencialidades.

RESUMO

A quimioterapia é a terapia oncológica mais explorada e que mais tem contribuído para a diminuição da morbilidade e mortalidade em cancro. No entanto, apresenta desvantagens nomeadamente pelo desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais e dos efeitos secundários resultantes da falta de selectividade dos compostos para essas mesmas células. Neste sentido, torna-se crucial a procura incessante de compostos com elevada actividade anti-tumoral, que possam constituir uma melhor alternativa face aos utilizados clinicamente. O presente trabalho teve como objectivo caracterizar o potencial anti-tumor dos complexos organometálicos $[\text{Co}(\text{PTA})_3\text{Cl}_2]$ (I), $[\text{Zn}(\text{DION})_2]\text{Cl}_2$ (II), $[\text{Co}(\text{DION})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]\text{BF}_4$ (III) e $[\text{Zn}(\text{DION})(\text{PTA})\text{Cl}]\text{BF}_4$ (IV) e respectivos ligandos (DION=1,10-fenantrolina-5,6-diona); (PTA=1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano). Estudos de viabilidade celular na presença daqueles complexos e ligandos, nas linhas tumorais HCT116 e HepG2, permitiram identificar os complexos II, III e IV, bem como o próprio ligando DION, com elevada actividade anti-tumoral. A citotoxicidade observada deveu-se sobretudo a mecanismos de indução de morte celular por necrose. A exposição destes complexos e do ligando DION a células de *S. cerevisiae* permitiu confirmar o potencial citotóxico e citostático destes. A indução de enzimas de resposta a *stress*, tais como chaperonas citoplasmáticas e mitocondriais, de proteínas envolvidas na degradação de proteínas alteradas e a repressão da glicólise são alguns dos mecanismos utilizados pela levedura para aquisição de resistência e adaptação ao crescimento na presença destes compostos. Os compostos apresentam afinidade para o DNA (III>II>IV) aparentando interagir por posicionamento nos sulcos ou intercalação. O composto III introduz quebras em cadeia dupla no DNA (cujo mecanismo não parece ser dependente da indução de espécies reactivas de oxigénio) mas não se apresentou genotóxico, não induzindo formação de aberrações cromossómicas em células V79. Além disso, não se observou nenhuma célula em metáfase na presença deste composto, pelo que poderá ter capacidade de induzir paragem do ciclo celular.

Termos chave: Complexos organometálicos, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, Actividade antitumoral, Proteoma, Alvos Biológicos, Interação com DNA.

ABSTRACT

Chemotherapy is the most explored oncological therapy with the highest impact on cancer-induced morbidity and mortality. However, it has disadvantages, namely the development of resistance by tumor cells and the side effects. In this context and according to the high mortality rate associated with some types of cancer, it becomes crucial to seek for novel compounds with high activities against tumor cells and an alternative to those used in clinical practice.

Viability assays using HCT116 and HepG2 tumor cell lines allowed the characterization of the antitumor potential of the organometallic complexes $[\text{Co}(\text{PTA})_3\text{Cl}_2]$ (I), $[\text{Zn}(\text{DION})_2]\text{Cl}_2$ (II), $[\text{Co}(\text{DION})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]\text{BF}_4$ (III) e $[\text{Zn}(\text{DION})(\text{PTA})\text{Cl}]\text{BF}_4$ (IV) and their ligands (DION=1,10-phenanthroline-5,6-dione); (PTA=1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane). DION complexes (compounds II, III and IV) and DION itself showed the highest antitumor activity. The observed cytotoxicity, denoted by the decrease in cellular viability, was due mainly to the induction of cell death by necrosis. This cytotoxicity in concert with a cytostatic effect was confirmed after exposure of *S. cerevisiae* BY4741 cells to compounds II, III, IV and DION.

Yeast adaptive response to these compounds included the repression of glycolysis enzymes and the increased levels of stress enzymes such as cytosolic and mitochondrial chaperones and enzymes involved in degradation of damaged proteins.

Compounds II, III and IV demonstrate a DNA binding affinity (III>II>IV) interacting by intercalation or groove-binding. Compound III is capable to induce DNA double strand breaks (without the involvement of reactive oxygen species) but do not induce chromosomal aberrations on V79 cells and hence it has not been considered as genotoxic, nevertheless, It was apparently able to induce cell cycle arrest since metaphase cells were not observed during karyotype analysis of V79 cells.

Keywords: Organometallic complexes, 1,10-phenanthroline-5,6-dione, Antitumor activity, Proteome, Biological Targets, DNA Interaction.

LISTA DE ABREVIATURAS

A2780	linha celular de cancro de ovário humano
A-498	linha celular de carcinoma renal humano
Abs	absorvância
APAF1	“ <i>Apoptosis protease activating factor 1</i> ”
APS	persulfato de amónia (do inglês, <i>ammonium persulfate</i>)
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BAX	gene codificante para a proteína pró-apoptótica Bax, da família Bcl-2
Bel-7402	Linha celular de hepatocarcinoma
CHANG	hepatócitos humanos
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato
DION	1,10-fenantrolina-5,6-diona
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DMEM	“ <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> ”
DMSO	dimetilsulfóxido
DO ₆₀₀	absorvância a 600 nanómetros
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino terá-acético
en	etilenodiamina
FBS	soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
HCC	carcinoma hepatocelular (do inglês, <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HCT116	linha celular de cancro colorectal humano
HepG2	linha celular de carcinoma hepatocelular humano
his	histidina
HK-2	células epiteliais humanas do túbulo proximal renal
IC ₅₀	concentração de composto para o qual existe redução da viabilidade celular para
IPG	gradiente de pH imobilizado (do inglês, <i>immobilized pH gradient</i>)
Kb	constante de ligação
leu	leucina
mal	malonato
MALDI-MS	“ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry</i> ”
MCF-7	linha celular de cancro de mama humano
MDR	resistência a múltiplos compostos (do inglês, <i>Multiple Drug Resistance</i>)
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
met	metionina
MMB	meio mínimo (do inglês, <i>minimal medium broth</i>)

MMC	mitomicina C
mtDNA	DNA mitocondrial
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)
NER	reparação por excisão de nucleótidos (do inglês, <i>nucleotide excision repair</i>)
pBSK II+	DNA plasmídico pBluescript SK+
pDNA	DNA plasmídico
PDR	resistência a múltiplos compostos em levedura (do inglês, <i>pleiotropic drug resistance</i>)
phen	1,10-fenantrolina
PI	iodeto de propídio (do inglês, <i>propidium iodide</i>)
PMF	“ <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> ”
PMS	metossulfato de fenazina (do inglês, <i>phenazine methosulphate</i>)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PS	fosfatidilserina (do inglês, <i>phosphatidylserine</i>)
RNA	ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	espécies reactivas de oxigénio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N'-Tetrametiletilenodiamina
TERC	“ <i>Telomerase RNA Component</i> ”
TERT	“ <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> ”
TP53	gene codificante para a proteína p53
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
TNF	factor de necrose tumoral (do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>)
TS/A	Linha celular de adenocarcinoma espontâneo de mama humano
ura	uracilo
V79	fibroblastos pulmonares de <i>Cricetulus griseus</i>
YNB	“ <i>Yeast Nitrogen Base</i> ”
YPD	“ <i>Yeast Peptone Dextrose</i> ”
ZIP1	gene codificante para proteína envolvida na internalização de zinco
°C	graus Celsius
μ	taxa específica de crescimento ($\ln 2/\text{tempo de duplicação}$)
t_d	tempo de duplicação
ϵ	coeficiente de extinção molar
l	percurso óptico
% (p/v)	percentagem peso/volume
% (v/v)	percentagem volume/volume

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Dependência da incidência de cancro com a idade, por sexo.	1
Figura 1.2 – Incidência e mortalidade por tipo de cancro, na Europa, considerando ambos os sexos.	2
Figura 1.3 – Aquisição de vantagem proliferativa e de potencial maligno através da ocorrência e acumulação de mutações.	3
Figura 1.4 – Processo de invasão local e de metastização em órgãos afastados do foco primário por transporte de células tumorais através dos vasos sanguíneos ou linfáticos.	4
Figura 1.5 – Representação esquemática das características primárias das células cancerígenas	5
Figura 1.6 – Cascatas de sinalização na apoptose.	7
Figura 1.7 – Organização dos vários tipos de agentes antitumorais de acordo com o seu mecanismo de acção e alvos celulares.	8
Figura 1.8 – Mecanismos gerais de resistência a compostos antitumorais.	10
Figura 1.9 – Estrutura química da cisplatina.	10
Figura 1.10 – Bioactivação da cisplatina.	11
Figura 1.11 – Formação de aductos no DNA através de reacções de substituição nucleofílica, envolvendo complexos metálicos.	12
Figura 1.12 – Mecanismos de acção da cisplatina resultantes.	12
Figura 1.13 – Alterações estruturais na hélice dupla de DNA resultantes da formação de aductos.	13
Figura 1.14 – Formas de interacção entre complexos metálicos e DNA sem o estabelecimento de ligações covalentes.	14
Figura 1.15 – Desenrolamento e alongamento da hélice dupla de DNA provocados pela interacção com agentes intercalantes mono- e bifuncionais.	14
Figura 1.16 – Hidrólise espontânea da ligação fosfodiéster, com formação de um intermediário pentacoordenado.	16
Figura 1.17 – Mecanismos de catálise da hidrólise de ligações fosfodiéster promovida por átomos metálicos.	17
Figura 1.18 – Estrutura química dos complexos organometálicos utilizados no presente estudo.	18
Figura 1.19 – Mecanismos de acção pro-apoptótica do zinco.	19
Figura 3.1 – Efeito dos compostos I, II, III e IV e da doxorrubicina sobre a viabilidade celular das linhas tumorais HCT116 e HepG2.	35
Figura 3.2 – Efeito dos ligandos DION e PTA sobre a viabilidade celular das linhas tumorais HCT116 e HepG2.	37
Figura 3.3 – Avaliação dos efeitos dos compostos II, III e IV, de DION e da doxorrubicina sobre a morfologia nuclear e a condensação da cromatina em células HCT116, por marcação com <i>Hoechst</i> 33258.	38
Figura 3.4 – Ensaio de citometria de fluxo para a marcação com Isotiocianato de Fluoresceína,	40

conjugado com Anexina-V, e Iodeto de propídio de células da linha HCT116 incubadas na presença dos compostos II, III e IV, de DION e de cloreto de zinco.

Figura 3.5 – Avaliação da distribuição de células HCT116 incubadas com composto II em termos de dimensões e granulosidade interna. 41

Figura 3.6 – Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 na presença dos compostos II, III e IV. 42

Figura 3.7 – Electroforese bidimensional (2-D) de extractos totais de células de *S. cerevisiae* recolhidas após 24 horas de incubação na presença dos compostos II, III e IV. 45

Figura 3.8 – Vias metabólicas e proteínas alteradas em *S. cerevisiae* após 24 horas de incubação na presença dos compostos II, III e IV. 48

Figura 3.9 – Electroforese bidimensional (2-D) de extractos totais de células de *S. cerevisiae* incubação na presença dos compostos II, III e IV, recolhidas durante a fase exponencial. 51

Figura 3.10 – Vias metabólicas e proteínas alteradas em *S. cerevisiae* na presença dos compostos organometálicos II, III e IV. 53

Figura 3.11 – Espectros de ultravioleta dos compostos II, III e IV e da doxorrubicina na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA de timo de bezerro. 55

Figura 3.12 – Aplicação da variação do comportamento espectral dos compostos II, III e IV e da doxorrubicina por adição de alíquotas de DNA de timo de bezerro ao cálculo das constantes de ligação ao DNA. 57

Figura 3.13 – Efeito da incubação de DNA plasmídico com várias concentrações dos compostos II, III e IV. 60

Figura 3.14 – Mecanismo de clivagem de ligações fosfodiéster para o complexo $[Zn(phen)(DION)Cl]^+$. 61

Figura 3.15 – Representação de reacções de clivagem de ligações fosfodiéster catalizadas pelos complexos $[Co(cyclen)(OH)(OH_2)]^{2+}$ e $[Co(tamen)(OH)(OH_2)]^{2+}$ e proposta para o composto III. 62

Figura 3.16 – Efeito do tempo de incubação sobre a interacção do composto III com DNA plasmídico. 63

Figura 3.17 – Ajuste, por modelação molecular, de $[Cu(phen)_2]^+$ ao sulco menor de uma hélice dupla de DNA. 64

Figura 3.18 – Efeito do composto III na indução de aberrações cromossómicas em células V79. 65

Figura 3.19 – Avaliação, por microscopia de fluorescência, da formação de espécies reactivas de oxigénio por incubação de células de *S. cerevisiae* BY4741 com H_2O_2 durante 2 e 4 horas. 66

Figura 3.20 - Identificação da formação de espécies reactivas de oxigénio, por microscopia de fluorescência, após incubação de células de *S. cerevisiae* BY4741 durante 2 horas, na presença dos compostos II, III e IV, de DION e de H_2O_2 . 67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Fórmulas químicas e informação necessária à preparação das soluções <i>stock</i> para os complexo organometálico e os ligandos (PTA e DION).	23
Tabela 2.2. – Condições utilizadas em cada um dos passos do programa de focagem isoelétrica.	29
Tabela 3.1 – Taxa específica de crescimento (μ) e respectivo tempo de duplicação (t_d) resultantes das curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .	44
Tabela 3.2 – Perfis de expressão proteica de células de <i>S. cerevisiae</i> , nas fases de latência e exponencial de crescimento, por exposição aos compostos II, III e IV.	44
Tabela 3.3 – Valores correspondentes aos coeficientes de extinção molar (ϵ) e às constantes de ligação (K_b) a DNA de timo de bezerro.	58

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CANCRO	1
1.2. APOPTOSE	6
1.3. QUIMIOTERAPIA E CLASSIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTI-TUMORAIS	7
1.4. EFEITOS ADVERSOS ASSOCIADOS À QUIMIOTERAPIA	9
1.5. COMPLEXOS METÁLICOS	10
1.6. INTERACÇÃO COMPLEXOS METÁLICOS-DNA	11
1.7. RNA E PROTEÍNAS COMO ALVOS CELULARES DE COMPLEXOS METÁLICOS	17
1.8. COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS EM ESTUDO	18
1.9 CARCINOMA HEPATOCELULAR E CARCINOMA COLORECTAL	20
1.10 LEVEDURA COMO ORGANISMO EUCARIOTA MODELO	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. COMPOSTOS EM ESTUDO	23
2.2. ESTUDOS EM LINHAS CELULARES HCT116 E HEPG2	23
2.2.1. MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES	23
2.2.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	24
2.2.3. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA NUCLEAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA: MARCAÇÃO COM <i>HOECHST 33258</i>	25
2.2.4. DETECÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO	25
2.3. ESTUDOS COM O ORGANISMO EUCARIOTA MODELO <i>S. cerevisiae</i>	26
2.3.1. ESTIRPE, MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	26
2.3.2. ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE AOS COMPOSTOS	26
2.3.3. PROTEÓMICA	27
2.3.3.1. EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS AOS COMPOSTOS E EXTRACÇÃO DAS PROTEÍNAS	27

2.3.3.2. PRECIPITAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	28
2.3.3.3. FOCAGEM ISOELÉCTRICA (1ª DIMENSÃO)	28
2.3.3.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A 2ª DIMENSÃO	29
2.3.3.5. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (2ª DIMENSÃO)	29
2.3.3.6. REVELAÇÃO DOS GÉIS	29
2.3.3.7. DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE INFORMÁTICA DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	29
2.3.3.8. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MALDI-TOF	30
2.4. TITULAÇÕES UV	30
2.5. OBTENÇÃO DO DNA PLASMÍDICO	31
2.6. ESTUDOS DE CLIVAGEM DE DNA PLASMÍDICO	32
2.7. ENSAIOS DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELECTROFORÉTICA DE PDNA DEPENDENTE DO TEMPO	32
2.8. INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS	33
2.8.1. CULTURA DE LINHAS CELULARES	33
2.8.2. CHOQUE HIPOTÓNICO E FIXAÇÃO	33
2.8.3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA OBSERVAÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS	33
2.9. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. ENSAIOS EM LINHAS CELULARES NEOPLÁSICAS	35
3.2. UTILIZAÇÃO DE <i>S. cerevisiae</i> COMO ORGANISMO EUCARIOTA MODELO	42
3.3. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO COM O DNA	54
3.3.1. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS: AFINIDADE E MODO DE LIGAÇÃO AO DNA	54
3.3.2. ENSAIOS COM DNA PLASMÍDICO	59
3.3.3. ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE POR AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS	64
3.4. AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO	66
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. CANCRO

O cancro é, actualmente, uma das principais causas de morte a nível mundial. Sabendo que a sua incidência aumenta acentuadamente com a idade (Figura 1.1) e que a população dos países desenvolvidos se encontra cada vez mais envelhecida, fruto do desenvolvimento contínuo da tecnologia, aliado ao conhecimento médico, estima-se que no futuro o número de indivíduos afectados por cancro seja superior ao actual. De facto, prevê-se que em 2030 o número anual de mortes por cancro ascenda, a nível mundial, aos 12 milhões, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2011).

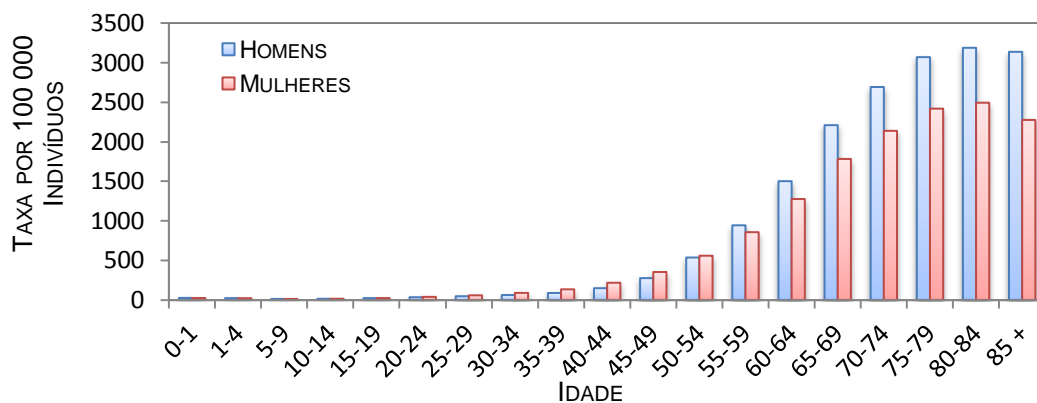


Figura 1.1 – Dependência da incidência de cancro com a idade, por sexo. Dados referentes à população dos Estados Unidos da América entre 2004 e 2008 (Surveillance Epidemiology and End Results, National Institute of Cancer, 2008).

Em contrapartida, de acordo com a Sociedade Americana de Cancro, a incidência de alguns tipos de cancro tem vindo a diminuir, como é o caso do cancro dos pulmões e próstata nos homens, da mama e do útero em mulheres e do estômago e colorectal em ambos os sexos (American Cancer Society, 2010). Estes progressos são devidos, possivelmente, a uma estratégia de prevenção, nomeadamente por campanhas de incentivo ao rastreio e às novas políticas de proibição de tabaco em locais públicos. No entanto, do ponto de vista da terapêutica, não obstante todo o esforço que tem sido feito neste domínio, é ainda necessário otimizar as terapias oncológicas existentes ou criar novas formas de tratamento com base em novas abordagens. Na figura 1.2 estão representadas as taxas de incidência e mortalidade em cada tipo de cancro, permitindo obter uma visão acerca da eficácia das terapias utilizadas actualmente. De facto, se para alguns tipos de cancro os tratamentos permitem que menos de um terço dos indivíduos afectados venha a morrer da doença, como é o caso, por exemplo, dos cancros da mama, próstata, útero, tireóide e testículos, existem também variantes da doença para as quais as terapias utilizadas não são

completamente eficazes, das quais são exemplo os cancros de pulmão, estômago, fígado, pâncreas e esófago.

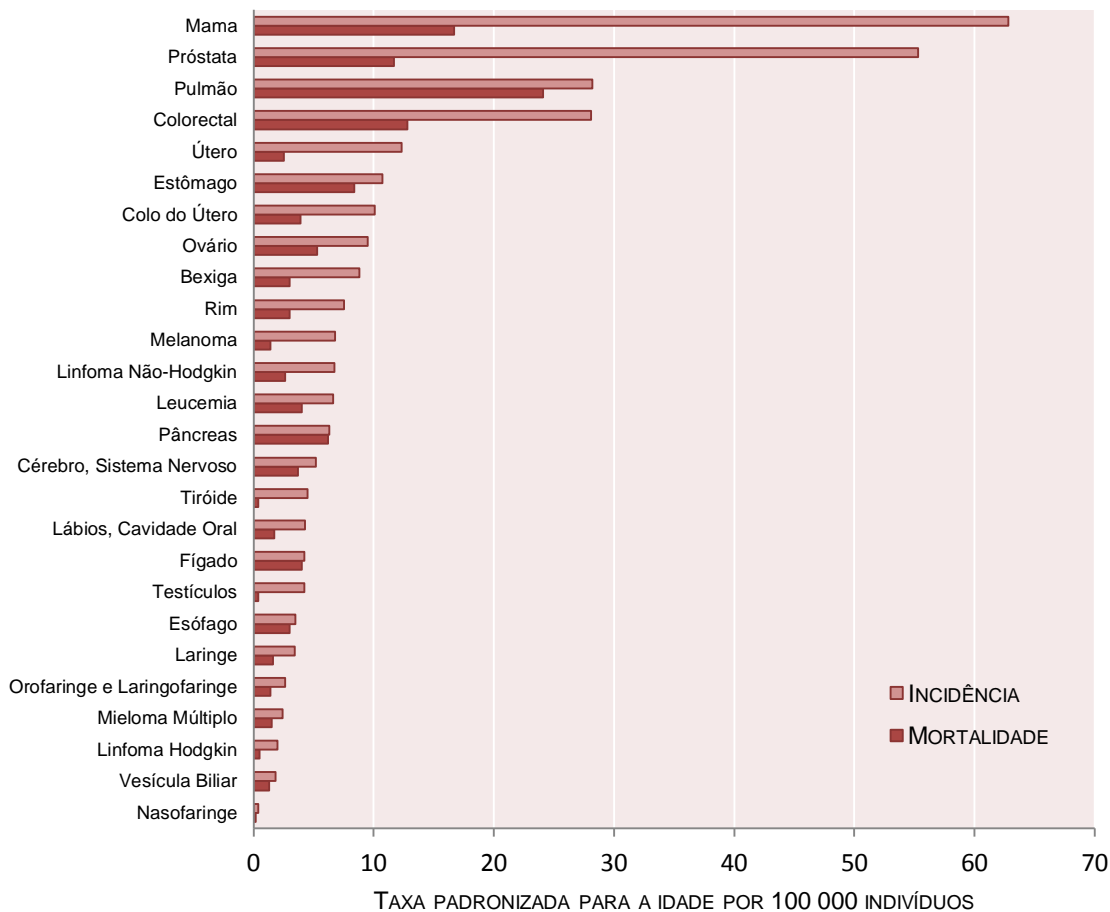


Figura 1.2 – Incidência e mortalidade por tipo de cancro, na Europa, considerando ambos os sexos. Dados de 2008. (International Organization for Research on Cancer, 2008)

O desenvolvimento das várias características tipicamente associadas às células neoplásicas depende da aquisição de alterações nos seus genomas (Hanahan e Weinberg, 2011). A instabilidade genómica está presente na maioria dos cancros humanos e em todos os seus estádios de desenvolvimento, desde lesões pré-cancerosas até cancros em fases avançadas (Negrini *et al.*, 2010). A instabilidade cromossómica constitui a principal forma de instabilidade genómica associada a cancros humanos e consiste num aumento da taxa de aquisição de alterações na estrutura e/ou número de cromossomas ao longo do tempo (Negrini *et al.*, 2010), sendo causada por falhas ao nível da segregação dos cromossomas ou do ponto de controlo do fuso mitótico (Aguilera e Gómez-González, 2008). Outras formas de instabilidade genómica descritas incluem a instabilidade de microsatélites, que consiste na expansão ou contracção do número de repetições de nucleótidos, e a frequência aumentada de mutações pontuais (Negrini *et al.*, 2010). De facto, o número de mutações encontradas em células

tumorais é superior ao que seria justificável tendo em conta a taxa de mutação somática (Lewin, 2004), que é de cerca de 10^{-6} por divisão celular (Dixon e Kopras, 2004). O aumento desta taxa em células tumorais poderá dever-se à inactivação de genes envolvidos na reparação de DNA (Lewin, 2004). Além destes, existem outros genes que quando mutados têm um papel fundamental na tumorigénese: os **oncogenes**, que derivam de proto-oncogenes activados inadequadamente através de mutações de ganho de função e que codificam para produtos que desencadeiam o processo tumoral e os genes **supressores de tumores**, cuja perda de função tem, também, implicações tumorigénicas (Lewin, 2004). Oncogenes e supressores de tumores têm funções opostas: os supressores de tumores garantem o cumprimento dos pontos de controlo do ciclo celular, e portanto quando perdem a sua função são perdidas algumas restrições sobre a progressão do ciclo; por sua vez, os produtos da expressão de oncogenes, bloqueiam os pontos de controlo do ciclo celular, evitando a sua paragem em situações de danos no DNA (Chow, 2010). Vários estudos têm demonstrado que a activação de oncogenes está relacionada com a instabilidade genómica, tanto em levedura (Lengronne e Schwob, 2002) como em culturas de células de mamífero (Woo e Poon, 2004), sugerindo que os oncogenes induzem stress ao nível da replicação de DNA (Halazonetis *et al.*, 2008), especialmente em regiões genómicas específicas, particularmente sensíveis a stress replicativo, designadas por locais frágeis (Negrini *et al.*, 2010). Estas regiões são frequentemente alvo de quebras cromossómicas como resultado da inibição da replicação.

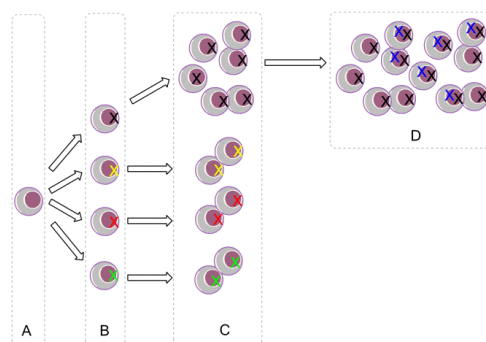


Figura 1.3 – Aquisição de vantagem proliferativa e de potencial maligno através da ocorrência e acumulação de mutações. Adaptado de Lewin, 2004.

Uma vez que as lesões pré-cancerosas apresentam frequentemente manutenção da actividade p53, proteína envolvida no controlo de danos no DNA, e que o gene supressor de tumores que a codifica, *TP53*, se encontra mutado na maioria dos cancros humanos, a instabilidade genómica resultante da activação de oncogenes poderá estar relacionada com a inactivação deste gene, causando perda da função da proteína p53 e transformando consequentemente lesões pré-cancerosas em cancerosas, com capacidade para evitar a senescência e a apoptose (Negrini *et al.*, 2010).

A tumorigénese tem, portanto, na sua origem o desenvolvimento de variabilidade genotípica (figura 1.3 B) como resultado da instabilidade genómica referida, conferindo alguns genótipos vantagem selectiva no ambiente local do tecido em causa, permitindo que as respectivas células se multipliquem

mais activamente que as restantes (figura 1.3 C) (Hanahan e Weinberg, 2011; Lewin, 2004). A subsequente acumulação sucessiva de mutações nestas células com capacidades proliferativas aumentadas traduz-se no desenvolvimento de características cancerígenas, ou seja, na carcinogénese (figura 1.3 D) (Lewin, 2004). Estas características consistem nas capacidades de invasão local, de nódulos linfáticos e de órgãos distantes do foco primário (metastização) (figura 1.4) e determinam o carácter maligno do cancro (Ruddon, 2007). Um tumor benigno, por outro lado, consiste apenas numa população de células com proliferação descontrolada mas que se mantém confinada espacialmente.

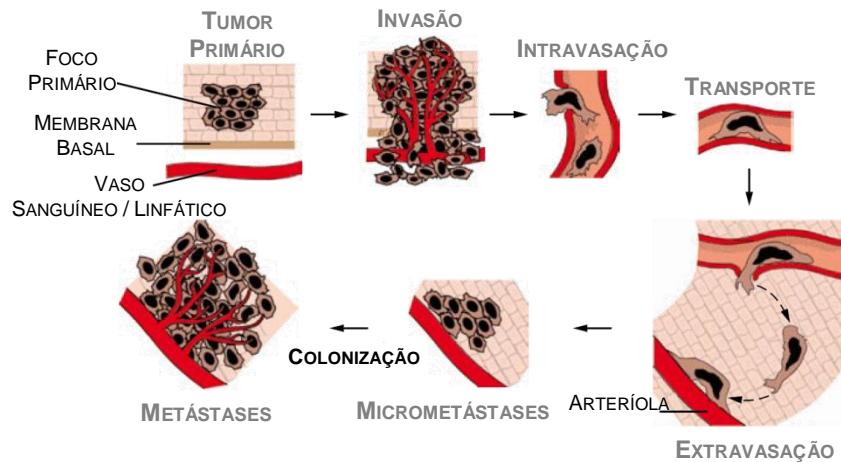


Figura 1.4 – Processo de invasão local e de metastização em órgãos afastados do foco primário por transporte de células tumorais através dos vasos sanguíneos ou linfáticos. Adaptado de Weinberg, 2008.

O desenvolvimento de características tumorais tem sido também associado, a par da instabilidade genómica, a estados inflamatórios resultantes de infeções (*Helicobacter pylori* e Vírus do Papilloma e da Hepatite relativamente aos cancros do estômago, do útero e do fígado, respectivamente), doenças auto-imunes (doença de Crohn e cancro do cólon) ou de origem desconhecida (prostatite e cancro da próstata) (Colotta *et al.*, 2009). O microambiente do tumor é enriquecido, como consequência da inflamação, com factores de crescimento, de sobrevivência e pró-angiogénicos, bem como enzimas modificadoras da matriz extracelular, que facilitam a angiogénese, a invasão e a metastização (Hanahan e Weinberg, 2011).

O cancro é uma doença multifactorial, na medida em que os danos na informação genética podem ser potenciados por factores ambientais como exposição a radiação ionizante ou agentes químicos mutagénicos, além de existir maior predisposição para o desenvolvimento de algumas formas desta patologia, adquirida hereditariamente, por oposição às variantes esporádicas (Lobo, 2008). Tem sempre origem num desequilíbrio entre divisão e morte celulares e numa desregulação ao nível da diferenciação das células, resultando num potencial replicativo ilimitado, o que leva a uma multiplicação descontrolada (Ruddon, 2007). As células tumorais perdem a capacidade de inibição da divisão dependente da densidade, o que numa situação normal resultaria numa inibição da proliferação após a população ter atingido um determinado número de células (Bozzone, 2007). Apesar de inicialmente ter sido atribuído a

este mecanismo o termo de inibição por contacto, o contacto físico entre células adjacentes poderá não ser o único factor responsável pela paragem da multiplicação celular (Alberts *et al.*, 2008). A incapacidade de formar junções de aderência, envolvidas neste tipo de contacto, resulta numa desordem espacial e interfere também na transmissão de sinais inibidores de crescimento (Hanahan e Weinberg, 2000). Além disso, as células tumorais, contrariamente às células saudáveis, podem adquirir: (i) autonomia relativamente aos sinais de crescimento; (ii) resistência à senescência e à apoptose, respectivamente envelhecimento e morte celulares; (iii) capacidade de desencadear e manter a angiogénese, ou seja, induzir a vascularização do tumor e por conseguinte o fornecimento de oxigénio e nutrientes; e (iv) um potencial replicativo ilimitado (imortalização), devido à sobreexpressão da enzima telomerase, que impede o encurtamento das regiões teloméricas (Hanahan e Weinberg, 2000) (Figura 1.5).

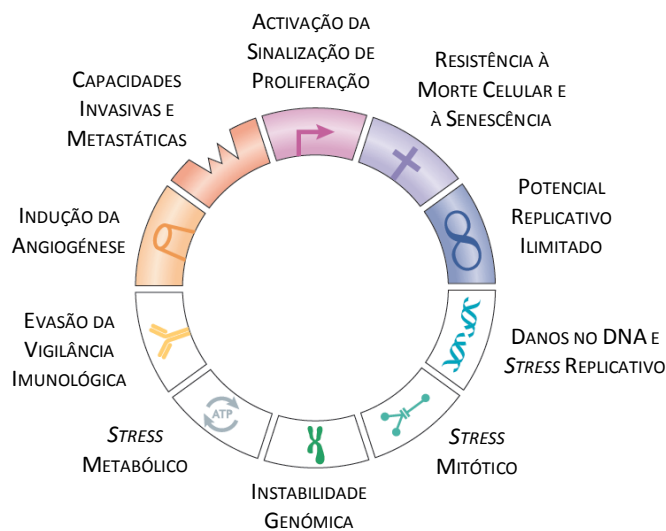


Figura 1.5 – Representação esquemática das características primárias das células cancerígenas, de acordo com Negrini e colaboradores (2010). A activação da sinalização de proliferação inclui a auto-suficiência em termos de sinalização de crescimento e insensibilidade a factores anti-crescimento. Os autores referem ainda como características secundárias o *stress* oxidativo, que pode ser incluído no *stress* metabólico, e o *stress* proteotóxico, que consiste na acumulação de proteínas *misfolded* por desequilíbrio entre a síntese e a degradação proteica, ser uma consequência da instabilidade genómica. A inflamação, cuja potenciação do desenvolvimento tumoral foi já brevemente abordada, é também considerada por vários autores como uma das características associadas a células neoplásicas (Hanahan e Weinberg, 2011; Colotta *et al.*, 2009; Mantovani, 2009), pelo que apesar de não se encontrar representada na figura deverá ser tomada em consideração.

Além destas características, são também de salientar o *stress* metabólico, a evasão ao controlo pelo sistema imunológico, a afectação dos processos mitóticos e a alteração da informação genética, bem como a capacidade, já mencionada, que as células cancerígenas apresentam de invadir localmente o tecido afectado e de formar tumores secundários, ou metástases, por migração através dos sistemas sanguíneo ou linfático (Figura 1.5).

1.2. APOPTOSE

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em 1972 (Kerr *et al.*, 1972) para descrever a manifestação morfológica associada à morte celular programada, descrita alguns anos antes (Lockshin e Williams, 1965). A apoptose consiste num mecanismo de manutenção da homeostase dos tecidos, ocorrendo quer durante o desenvolvimento dos organismos como no seu envelhecimento, de forma a eliminar células envelhecidas ou células que tenham sofrido alterações, nomeadamente ao nível do DNA, cujos mecanismos de reparação não tenham conseguido reverter (Elmore, 2007). A desregulação das vias apoptóticas constitui uma situação patológica, podendo a sua inibição resultar em processos de autoimunidade ou cancro e a morte celular acelerada em doenças degenerativas, imunodeficiência ou infertilidade (Danial e Korsmeyer, 2004). A inibição da apoptose em células com alterações e mutações selectivas para uma progressão descontrolada é um dos vários mecanismos pelo qual as células tumorais se tornam resistentes à rádio e à quimioterapia, uma vez que a base destas terapias assenta muitas vezes na indução deste mecanismo de morte celular (Lowe e Lin, 2000; Igney e Krammer, 2002). As vias apoptóticas adquiriram, por este motivo, um papel primordial em oncologia, sendo de extrema importância o seu conhecimento, dado o seu impacto na terapêutica.

A apoptose é um mecanismo molecular tão complexo quanto importante, pelo que serão aqui abordadas apenas as suas características principais, necessárias à contextualização de parte deste trabalho. Resumidamente, existem duas vias apoptóticas possíveis: uma denominada extrínseca, na qual participam proteínas transmembranares da superfamília de receptores do factor de necrose tumoral (TNF, do inglês, *tumour-necrosis factor*) e às quais é dada a designação de receptores de morte, e outra via, designada intrínseca, que é iniciada pela estimulação da membrana mitocondrial (Igney e Krammer, 2002). Ambas as vias envolvem a acção de proteases específicas cisteína-aspartato designadas de caspases. As primeiras a serem activadas denominam-se caspases iniciadoras e consistem nas pró-caspases 8 e 10, activadas pelo complexo de morte (ligando-receptor de morte) na via extrínseca, e na pró-caspase 9, activada na via intrínseca pelo apoptossoma (complexo proteico o qual também integra, em conjunto com o citocromo *c* libertado pela mitocôndria, o factor de activação de proteases apoptóticas 1 (APAF1) e ATP). As caspases iniciadoras activam as caspases efectoras, dando origem a uma cascata proteolítica que amplifica a sinalização, e estas por sua vez clivam os vários substratos, dando origem às alterações bioquímicas e morfológicas características da apoptose (Figura 1.6) (Igney e Krammer, 2002).

Vários agentes quimioterapêuticos causam danos no DNA que resultam na activação da proteína p53, que promove a apoptose através da via intrínseca (figura 1.6). O facto da proteína p53 se encontrar mutada em grande parte dos cancros humanos torna as células resistentes à terapêutica (Brunelle e Zhang, 2010). No entanto, de forma a contornar este problema, tem sido desenvolvidos outros mecanismos de indução da apoptose, como por exemplo através da activação de outras proteínas (por exemplo, p63 e p73) também envolvidas na indução da via apoptótica intrínseca ou por desencadeamento da via apoptótica extrínseca (Brunelle e Zhang, 2010).

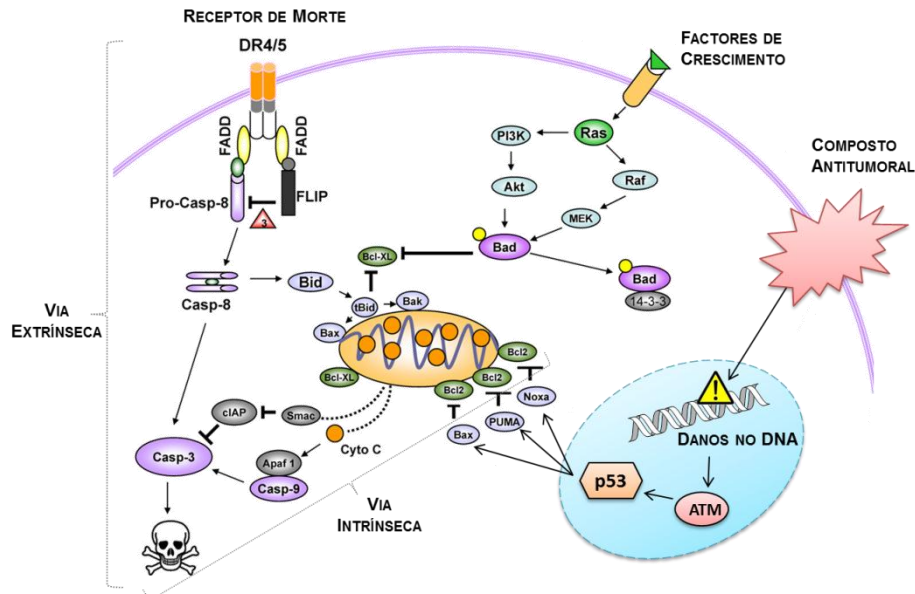


Figura 1.6 – Cascatas de sinalização na apoptose. As vias extrínseca (dependente da ligação de ligandos específicos a receptores de morte) e intrínseca (resultante da estimulação da mitocôndria) encontram-se interligadas pela proteína Bid, que ao ser activada através da via extrínseca, pode activar a intrínseca como forma de amplificação de sinal. A proteína p53 participa na promoção da via intrínseca após a sua actividade ser desencadeada como resposta a danos no DNA, que podem ser provocados, por exemplo, por agentes antitumorais genotóxicos. Adaptado de Brunelle e Zhang, 2010.

1.3. QUIMIOTERAPIA E CLASSIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ANTI-TUMORAIS

A quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia são as técnicas mais frequentemente aplicadas na terapia oncológica, individualmente ou em conjunto. Existem ainda outros tipos de tratamento utilizados em tipos específicos de cancro, como a terapia hormonal, imunoterapia, ablação, electrocoagulação, embolia, crioterapia, entre outros, mas que não vão ser discutidos por não fazerem parte do âmbito do presente trabalho. A escolha da técnica a utilizar depende do tipo e tamanho do tumor primário e da ocorrência ou não de metastização (American Cancer Society, 2010).

A quimioterapia, em particular, consiste na utilização de compostos químicos com capacidade de induzir morte celular ou de abrandar o ritmo da divisão das células. Os fármacos podem ser administrados oralmente (sob a forma de comprimidos, cápsulas ou em líquido), topicamente (sob a forma de creme) ou injectados na corrente sanguínea (intravenoso), no músculo (intramuscular), no fluido cefalo-raquidiano (intratecal - na parte inferior da coluna vertebral ou na cavidade de *Ommaya*), na cavidade peritoneal (intraperitoneal) ou sob a pele (subcutânea) (National Institute of Cancer, 2011).

A quimioterapia é possivelmente a terapia oncológica que pode ser mais explorada, na medida em que podem ser testadas as capacidades de indução de morte celular de inúmeros compostos. A crescente variedade e número de compostos antitumorais desenvolvidos até à data tornaram necessário o seu agrupamento em classes, definidas tendo em conta os respectivos mecanismos de acção ou

características químicas dos mesmos (Espinosa e Raposo, 2010). Apesar de estas classificações não serem totalmente rígidas e, portanto, variarem de autor para autor, existem algumas classes que são geralmente mantidas, como é o caso dos agentes alquilantes, dos antibióticos e dos antimetabolitos. Neste contexto, o termo antibiótico é aplicado para classificar substâncias, sintetizadas por microrganismos, que interactivam com o DNA (Paz, 2008). As restantes classes ou grupos poderão incluir inibidores de topoisomerases, inibidores da mitose (Espinosa e Raposo, 2010), agentes anti-microtúbulos e complexos de platina (Boulikas, 2008), existindo geralmente uma classe designada de “outros” onde são incluídos todos os compostos que não foram associados a uma das classes anteriores (Espinosa e Raposo, 2010; Boulikas, 2008). O facto de esta categoria incluir um número cada vez maior de compostos, levou a que fosse proposto um novo sistema de classificação, em que é proposta uma reestruturação da organização em detrimento da adição de novas categorias ao grupo já existente, sendo esta reclassificação baseada nos alvos dos compostos (Espinosa e Raposo, 2010).

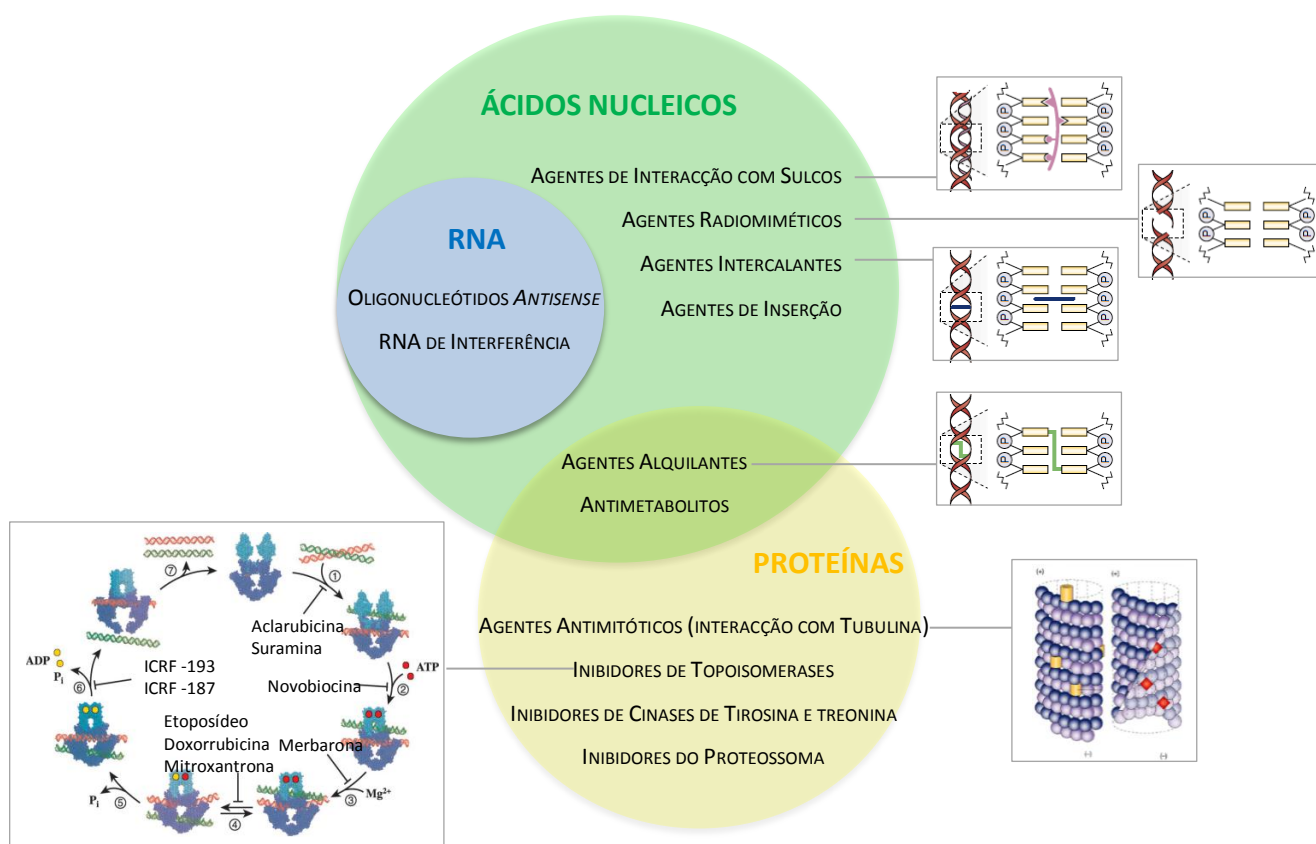


Figura 1.7 – Organização dos vários tipos de agentes antitumorais de acordo com o seu mecanismo de acção e alvos celulares. É necessário ter em conta que alguns inibidores da topoisomerase, como a doxorubicina e outras antraciclinas, inibem a actividade ligase da topoisomerase por se posicionarem na interface das duas macromoléculas (McClendon e Osheroff, 2007). No entanto, apesar de este mecanismo resultar na introdução de cortes numa das cadeias do DNA, é a actividade da topoisomerase que é bloqueada, pelo que os inibidores de topoisomerases foram agrupados como tendo como alvo proteínas. Adaptado de Jordan e Wilson, 2004; Larsen *et al.*, 2003; Hurley, 2002.

Apesar de esta abordagem ser extremamente interessante, o facto de compostos utilizados em quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal (categorias distintas segundo a classificação tradicional) apresentarem alvos em comum leva a que sejam agrupados em conjunto nesta nova proposta. Como a imunoterapia e a terapia hormonal não fazem parte do âmbito deste trabalho, é apresentada na figura 1.7 uma possível forma de organização apenas dos compostos utilizados em quimioterapia, com base nos seus alvos, tal como apresentado na referida proposta, mas também nos seus mecanismos de acção. É possível, assim, constatar mais prontamente que existem alvos distintos sujeitos aos mesmos mecanismos de acção, de que é exemplo o facto de proteínas e ácidos nucleicos serem ambos possíveis substratos de agentes alquilantes. Tendo em conta a enorme diversidade de complexos metálicos que podem ser projectados, como será discutido adiante, é provável que este tipo de compostos possa estar envolvido na totalidade ou pelo menos na maioria dos mecanismos de acção. No entanto, serão discutidos apenas aqueles que se encontram mais frequentemente associados aos complexos metálicos e cujo efeito destes sobre os respectivos alvos se encontre mais bem descrito.

1.4. EFEITOS ADVERSOS ASSOCIADOS À QUIMIOTERAPIA

Uma das desvantagens da quimioterapia prende-se com o desenvolvimento de resistência das células tumorais aos compostos utilizados. As células podem desenvolver resistência por exposição contínua aos fármacos, resistência adquirida, ou apresentar logo à partida uma resistência intrínseca (Heffeter *et al.*, 2008). Estima-se que uma em cada $10^6 - 10^7$ células cancerígenas apresente resistência intrínseca a um determinado composto (Luqmani, 2005). Como a maioria das células apresenta susceptibilidade aos fármacos, o que se verifica inicialmente com a sua administração é a regressão do tumor. No entanto, o pequeno número de células com resistência intrínseca, e que portanto sobrevive à exposição ao(s) fármaco(s), origina, após divisão, uma nova expansão tumoral, em conjunto com aquelas que desenvolveram resistência (Luqmani, 2005). As células tumorais expressam diferentes conjuntos de genes cujos produtos podem estar envolvidos na resistência aos fármacos utilizados em quimioterapia, existindo uma grande heterogeneidade no que respeita à resposta à terapia (Gottesman, 2002). Mesmo que os fármacos ou os novos compostos ainda em estudo tenham a capacidade de actuar sobre os respectivos alvos de forma significativa, as células tumorais além de apresentarem repressão das vias apoptóticas podem apresentar também uma capacidade aumentada de reparação de danos (Heffeter *et al.*, 2008). Além disso, os compostos podem sequer nem atingir os seus alvos por absorção insuficiente por parte das células; por distribuição inapropriada devida à fraca vascularização de alguns tumores; por aumento da sua excreção por mecanismos de efluxo (dos quais se salienta o papel relevante de transportadores de múltiplos compostos (MDR) onde se inclui a P-glicoproteína (MDR1) (Liu, 2009); por aumento da sua metabolização quer pelas próprias células tumorais como pelas saudáveis que se encontram na sua proximidade (Figura 1.8) (Heffeter *et al.*, 2008, Gottesman, 2002).

Apesar do fenómeno de resistência ser uma questão bastante importante, uma vez que pode comprometer o sucesso do tratamento, a quimioterapia apresenta também como desvantagem os efeitos

secundários provocados por alguns fármacos. Estes efeitos secundários advêm da acção dos fármacos utilizados sobre células saudáveis, tratando-se portanto de um problema de falta de selectividade. (Atkins e Gershell, 2002) A identificação de fármacos que inibam as células tumorais específica e selectivamente é um dos grandes objectivos da procura incessante de novos compostos antitumor (Tan *et al.*, 2009).

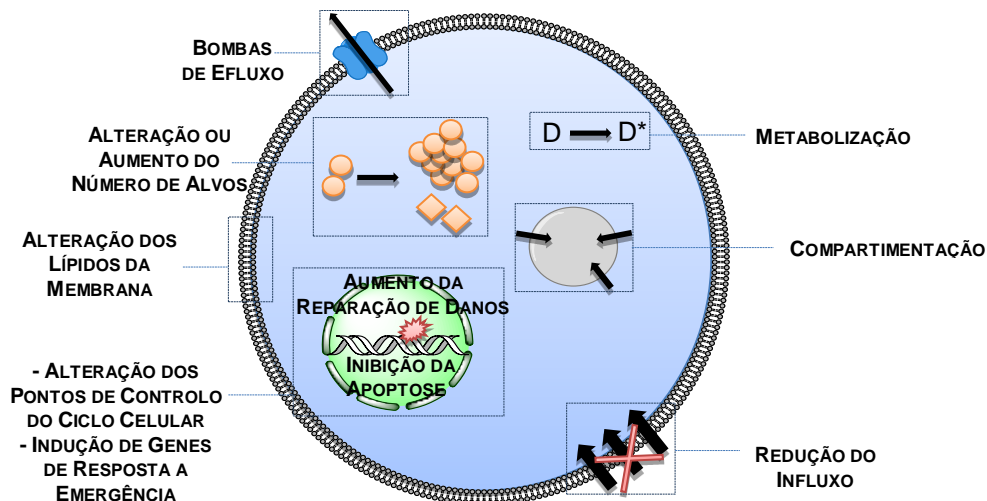


Figura 1.8 – Mecanismos gerais de resistência a compostos antitumorais: protecção do alvo, impedindo que o composto o atinja (alteração dos lípidos membranares, redução do influxo, promoção do efluxo, compartimentação), alteração do composto para uma forma inativa (bioinactivação/metabolização), alteração do alvo (estrutural ou quantitativa), potenciar a paragem do ciclo celular como resposta aos danos celulares e a indução de genes cujos produtos estão envolvidos em mecanismos de reparação. Adaptado de Gottesman, 2002.

1.5. COMPLEXOS METÁLICOS

A descoberta da actividade antitumoral da cisplatina (figura 1.9), um dos principais compostos utilizados na quimioterapia desde 1978 (Hannon, 2007), despertou o interesse sobre os complexos metálicos, dada a sua potencial aplicação terapêutica.

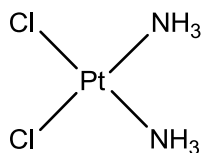


Figura 1.9 – Estrutura química da cisplatina. A quimioterapia de combinação baseada neste composto é bastante eficaz no tratamento de cancro testicular, do ovário, do pulmão, da cabeça e do pescoço. (Kartalou e Essigmann, 2001)

Este tipo de compostos consiste num átomo metálico central, ao qual se encontram ligados átomos ou moléculas denominados de ligandos. Quando o ligando é uma molécula, o átomo que está directamente ligado ao metal é chamado de átomo doador, uma vez que a ligação metal-ligando é estabelecida pela

partilha de um par de electrões, doado pelo ligando. Quando o ligando é composto por vários átomos com capacidade de estabelecer ligações com o metal diz-se polidentado. Contrariamente, quando apenas um dos átomos interage com o metal, o ligando designa-se monodentado. Relativamente aos centros metálicos, complexos mononucleares apresentam um único átomo metálico central enquanto os polinucleares são compostos por vários. Neste trabalho apenas serão estudados complexos mononucleares.

A multiplicidade de características inerentes aos centros metálicos, como por exemplo o seu estado de oxidação (actividade redox), e aos próprios ligandos, como a polaridade e a reactividade, permitem projectar e sintetizar uma variedade de compostos com variações ao nível da carga, da geometria e das propriedades cinéticas e termodinâmicas (Meggers, 2009). Assim, é possível sintetizar complexos com as características mais adequadas a um determinado objectivo. No caso da quimioterapia, é necessário que estes tenham capacidade de penetrar nas células, sejam suficientemente inertes, para que não haja dissociação dos ligandos, nos casos em que o efeito anti-tumoral se deva à acção do complexo intacto, mas também reactivos relativamente aos respectivos alvos celulares. Os complexos devem ainda ter capacidade de atingir estes alvos, caso estes não se encontrem directamente acessíveis no citoplasma.

Relativamente à inércia dos complexos, existem casos em que é necessária a alteração da sua estrutura no interior das células para que estes se tornem activos (bioactivação), como é o caso da cisplatina (Figura 1.10) (Kelland, 2007). De facto, alguns complexos metálicos com actividade antitumoral são transportados até às células numa forma inactiva (pró-fármaco), sendo depois metabolizados no interior destas, através de reacções de substituição de ligandos ou de transferência electrónica, dando origem às suas formas activas (Reisner *et al.*, 2008).

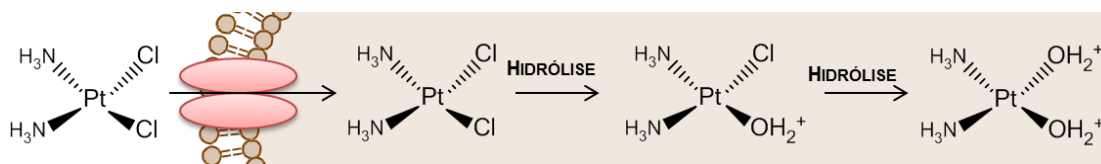


Figura 1.10 – Bioactivação da cisplatina por substituição dos átomos de cloro por moléculas de água. Esta substituição é favorecida no interior das células pelo facto da concentração intracelular de cloro ser significativamente inferior à extracelular. A coordenação da platina por moléculas de água torna o complexo mais reactivo, reagindo preferencialmente com grupos tiol de cisteínas ou metioninas. Por este motivo, nalgumas células com elevados níveis de glutathione ou metalotioneínas a cisplatina acaba por ser sequestrada e por não interagir com o DNA. Adaptado de Kelland, 2007.

1.6. INTERACÇÃO COMPLEXOS METÁLICOS-DNA

A natureza catiónica dos centros metálicos torna-os susceptíveis a ataques nucleofílicos, que dão origem a reacções de substituição de ligandos (substituição nucleofílica). Aminoácidos e nucleótidos constituem excelentes ligandos, por possuírem vários átomos com pares de electrões não partilhados, que podem actuar como nucleófilos (Zhang e Lippard, 2003). Por este motivo, a substituição nucleofílica é um dos modos através dos quais os complexos metálicos podem interagir com o DNA. Quando o

ataque nucleofílico é sobre o átomo metálico central, o nucleófilo fica directamente ligado a este, participando directamente na sua coordenação, resultando isto numa coordenação de esfera interna (Figura 1.11 A). Por outro lado, quando o ataque é sobre um átomo de um ligando, o nucleófilo estabelece uma ligação a este, dando origem a uma coordenação de esfera externa (figura 1.11 B). A coordenação de esfera externa pode ocorrer também pelo estabelecimento de ligações não-covalentes (figura 1.11 C), como pontes de hidrogénio entre o DNA e os ligandos, não dependendo de reacções de substituição nucleofílica. Assim, a participação do DNA na coordenação do metal poderá ocorrer (i) covalentemente por esfera interna e através de (ii) ligações covalentes e (iii) não-covalentes de esfera externa (Theophanides *et al.*, 2003).

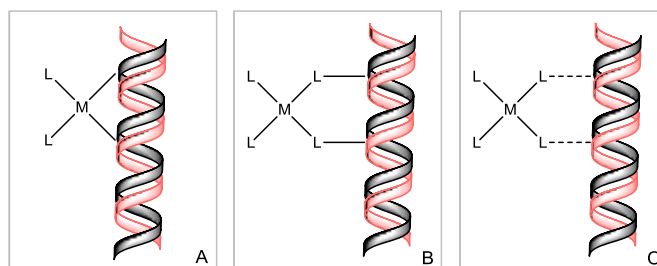


Figura 1.11 – Formação de aductos no DNA através de reacções de substituição nucleofílica, envolvendo complexos metálicos, que resultam em coordenações de esfera interna (A) e externa (B). Interação de esfera interna resultante do estabelecimento de ligações não-covalentes (C).

A substituição nucleofílica que resulta numa coordenação de esfera interna está, aliás, na base do mecanismo de acção da cisplatina (Aletras *et al.*, 1995). A cisplatina é frequentemente classificada como agente alquilante, apesar de não apresentar na sua estrutura nenhum grupo alquilo. Em alternativa, é também utilizado o termo agente platinante. O termo agente alquilante é utilizado para designar compostos capazes de introduzir covalentemente grupos alquilo em biomoléculas, em condições fisiológicas (Avendaño e Menéndez, 2008). No entanto, os mecanismos possíveis para a interacção entre a cisplatina e o DNA, tais como formação de aductos, ligações cruzadas intra- e inter-cadeia e complexos proteína-cisplatina-DNA (Figura 1.12) (Reedijk e Lohman, 1985), podem também resultar da interacção de outros agentes alquilantes com o DNA (Kondo *et al.*, 2010), pelo que existe partilha dos mecanismos de acção entre estes dois tipos de agentes químicos.

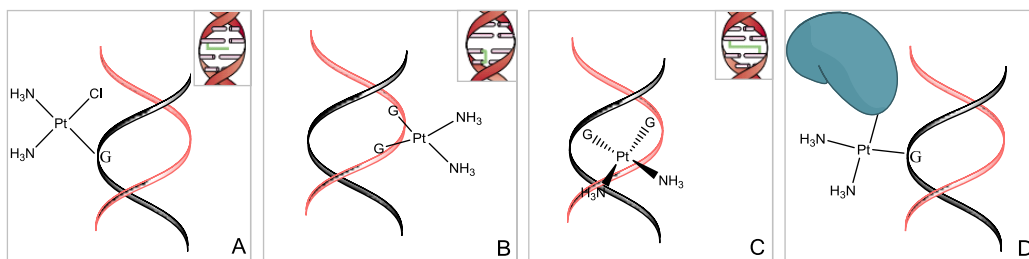


Figura 1.12 – Mecanismos de acção da cisplatina resultantes de reacções de substituição nucleofílica no DNA: (A) aducto, (B) ligação cruzada intra-cadeia, (C) ligação cruzada inter-cadeia, (D) complexo proteína-cisplatina-DNA. Adaptado de Reedijk e Lohman, 1985.

Compostos que, à semelhança da cisplatina, apresentem dois ligandos que funcionem como bons grupos de saída e que portanto apresentem capacidade de estabelecer duas ligações covalentes com o DNA são designados **agentes alquilantes bifuncionais** (Helleday *et al.*, 2008). Por outro lado, complexos capazes de estabelecer apenas uma ligação covalente são designados **agentes alquilantes monofuncionais**, que formam aductos no DNA por reagirem com única base (Helleday *et al.*, 2008). Como no final das fases G1 e S existe menos tempo disponível para a reparação do DNA, os efeitos citotóxicos dos agentes alquilantes são mais acentuados nestas fases, apesar destes compostos actuarem tanto em células em repouso como naquelas que se encontram em divisão (Avendaño e Menéndez, 2008). Os aductos provocam diversos tipos de alterações estruturais na hélice dupla de DNA como a torção, que resulta da ligação de um agente alquilante bifuncional a duas bases adjacentes da mesma cadeia (resultando numa ligação cruzada intracadeia), a rotação de bases sobre o esqueleto de açúcar-fosfato ou a desnaturação local (Figura 1.13), resultando na sua destabilização (Lenglet e David-Cordonnier, 2010). Por outro lado, a formação de ligações inter-cadeia impede a desnaturação local do DNA por estabilização da cadeia dupla (as ligações covalentes são irreversíveis, ao contrário das pontes de hidrogénio entre bases complementares), interferindo com processos dependentes da separação das duas cadeias do DNA, tais como a replicação e a transcrição do DNA (Yamamoto *et al.*, 2011).

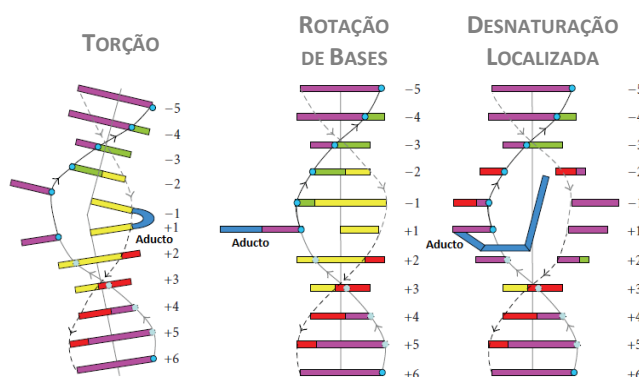


Figura 1.13 – Alterações estruturais na hélice dupla de DNA resultantes da formação de aductos. Adaptado de Lenglet e David-Cordonnier, 2010.

Existem também diversos modos de interacção reversível entre os complexos metálicos e o DNA não envolvendo portanto, o estabelecimento de ligações covalentes. Complexos contendo ligandos orgânicos (designados organometálicos) podem funcionar como **agentes intercalantes**, sendo a capacidade de intercalar com o DNA dependente da existência de estruturas aromáticas planares, capazes de originar empilhamento π - π com as bases azotadas. Isto é, neste tipo de complexos, os ligandos têm a capacidade de se posicionar entre dois pares de bases adjacentes (Figura 1.14, o que provoca um desenrolamento local da hélice dupla do DNA e consequentemente uma distorção da mesma (Figura 1.15) (Lenglet e David-Cordonnier, 2010).

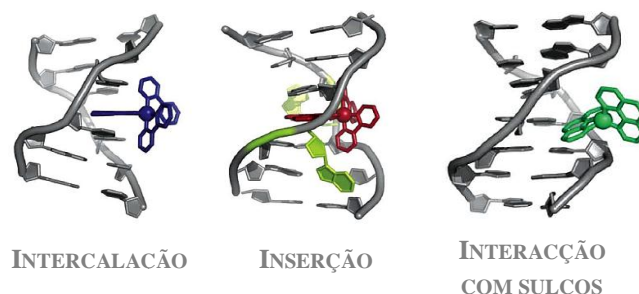


Figura 1.14 – Formas de interacção entre complexos metálicos e DNA sem o estabelecimento de ligações covalentes. Adaptado de Zelis *et al.*, 2007.

Moléculas compostas por duas unidades com capacidade de intercalação no DNA são designadas agentes intercalantes bifuncionais (Avendaño e Menéndez, 2008), por oposição aos intercalantes monofuncionais. Estudos relativos à estequiometria da intercalação revelaram que não ocorre ligação de um agente intercalante por cada par de base, ocorrendo no máximo interacção em posições alternadas, de acordo com o princípio da exclusão de posições adjacentes (*neighbour exclusion principle*) (Blackburn *et al.*, 2006). Trata-se portanto de um efeito de cooperatividade negativa, em que a interacção de um composto com um local de ligação provoca alterações conformacionais na hélice dupla, diminuindo a afinidade desse mesmo composto para os locais de ligação adjacentes (Avendaño e Menéndez, 2008). Um estudo relativo ao mecanismo de intercalação do azul-de-metileno no DNA revelou que este composto intercala preferencialmente pares alternados GpC (Rohs *et al.*, 2000). De facto, alguns compostos têm maior afinidade por determinadas sequências de bases: a doxorubicina, por exemplo, tem maior afinidade para locais TpA ou ApT enquanto a aclacinomicina, à semelhança do azul-de-metileno, prefere locais CpG ou GpC (Nakamoto *et al.*, 2008). Além disso, alguns agentes intercalantes apresentam ainda uma tendência para se posicionarem entre bases com uma ordem específica na sequência: 5'-purina-pirimidina-3' em detrimento de 5'-pirimidina-purina-3', ou vice-versa (Nakamoto *et al.*, 2008).

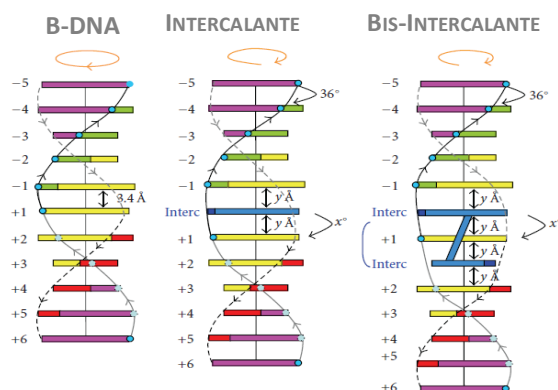


Figura 1.15 – Desenrolamento e alongamento da hélice dupla de DNA provocados pela interacção com agentes intercalantes mono- e bifuncionais. Os valores de x° e y são específicos do agente intercalante. Adaptado de Lenglet e David-Cordonnier, 2010.

Um processo de interacção com DNA muito semelhante à intercalação é a inserção: o complexo metálico provoca afastamento de um par de bases para o exterior da hélice dupla e insere-se no espaço resultante, com os seus ligandos aromáticos planares a substituírem a contribuição das bases afastadas para o empilhamento π - π (Figura 1.14). Este tipo de interacção tem como principais alvos pares termodinamicamente destabilizados resultantes de erros de emparelhamento, uma vez que apresentam distorção das pontes de hidrogénio (Zelis *et al.*, 2007).

Finalmente, a terceira forma de interacção não covalente com o DNA é a interacção com os sulcos (Figura 1.14). Este tipo de interacção não requer alterações conformacionais significativas do DNA, podendo ser considerado um mecanismo análogo ao modelo “chave-fechadura” para a ligação enzima-substrato, contrariamente à intercalação, que requer a formação de uma cavidade na hélice dupla. No entanto, as interacções hidrofóbicas são responsáveis pelo desencadeamento de ambos os mecanismos de interacção com o DNA e tanto os agentes intercalantes como os de interacção com sulcos são frequentemente moléculas carregadas positivamente (Chaires, 2006). Os factores dos quais depende a interacção com sulcos são a largura e profundidade do sulco (sendo os valores médios para os sulcos maior e menor, respectivamente, em DNA na forma B: 11,6 e 6,0 Å de largura e 8,5 e 8,2 Å de profundidade) e os factores electrostáticos, hidrofóbicos e de van der Waals (Neidle, 2001). Estudos efectuados por vários autores demonstraram, relativamente à maioria dos complexos mononucleares de metais inertes, a capacidade de interagirem com o sulco menor do DNA e preferencialmente com regiões ricas em A-T, devendo estar o estabelecimento de interacções de van der Waals e electrostáticas mais favoráveis, nestas regiões, na origem deste comportamento. Contudo, por oposição, estudos da interacção de compostos de cobalto com oligómeros com diferentes conteúdos de bases revelaram que existe ligação preferencial em sequências GG no sulco maior, devido à maior densidade de carga negativa encontrada nestas regiões (Keene *et al.*, 2009). A aplicação de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear permitiu verificar a indução de transição da forma B para a forma A dos oligómeros pelo complexo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (Xu *et al.*, 1993) e transições da forma B para as formas A e Z, dependendo da sequência dos oligómeros, pelo complexo $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ (en=etilenodiamina) (Xu *et al.*, 1995).

Alguns complexos metálicos podem ainda, além dos próprios iões metálicos, participar em mecanismos de clivagem do DNA. A introdução de quebras compromete a integridade da informação genética e consequentemente a viabilidade celular. As ligações fosfodiéster são extremamente inertes no que respeita à hidrólise espontânea (Figura 1.16), como demonstrado por (Schroeder, 2006) através do cálculo do tempo de meia vida do fosfato de dineopentilo em água a 25°C, que determinaram chegar aos 30 milhões de anos. Esta análise levou os autores a concluir que existe uma enorme resistência das ligações internucleotídicas ao ataque, pela água, aos átomos de fósforo.

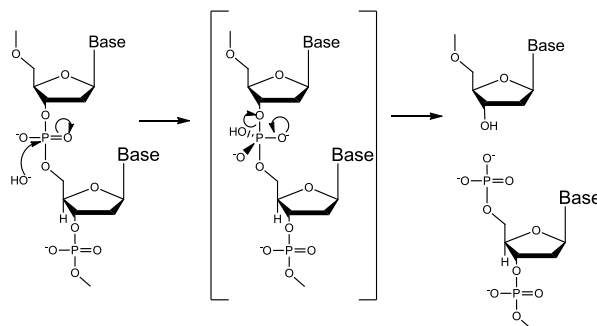


Figura 1.16 – Hidrólise espontânea da ligação fosfodiéster, com formação de um intermediário pentacoordenado. A hidrólise pode ser quer ao nível da ligação P-O3' (correspondente ao mecanismo apresentado e ao catalisado enzimaticamente) ou P-O5'. Adaptado de Mancin e Tecilla, 2009.

Esta resistência do DNA à hidrólise permite, portanto, manter a integridade da informação genética no meio aquoso em que se encontra. No entanto, existem processos biológicos dependentes da hidrólise das ligações fosfodiéster, como por exemplo, o sistema de reparação de danos por excisão de nucleótidos (via NER de *Nucleotide excision repair*). Assim, a ocorrência deste tipo de reacções encontra-se dependente da catálise por parte de enzimas como topoisomerases e nucleases. Estas enzimas apresentam iões metálicos como co-factores, como por exemplo Zn(II) e Mg(II), dado que estes podem promover a clivagem de ligações fosfodiéster através de diversos mecanismos (Figura 1.17) (Mancin e Tecilla, 2009).

Existem três mecanismos de catálise por activação directa: a coordenação do metal por um átomo de oxigénio do grupo fosfato, em que o átomo metálico funciona, portanto, como um ácido de Lewis e activa o átomo de fósforo relativamente ao ataque pelo nucleófilo (Figura 1.17 A); a activação do próprio nucleófilo por coordenação deste ao metal (Figura 1.17 B); e a coordenação do metal pelo átomo de oxigénio do grupo de saída, aumentando a sua capacidade de abandonar a esfera de coordenação do átomo de fósforo (Figura 1.17 C). Existem ainda dois modos de activação indirecta em que ocorre coordenação do metal: por iões hidroxilo que funcionam como bases catalisadoras (catálise básica) (Figura 1.17 D) ou por moléculas de água que actuam como ácidos catalisadores (catálise ácida) (Figura 1.17 E) (Mancin e Tecilla, 2009; Williams *et al.*, 1999).

Além destes mecanismos de catálise da clivagem hidrolítica, existe ainda a clivagem oxidativa, dependente da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS do Inglês *Reactive Oxygen Species*), e que pode ser fotoinduzida ou desencadeada pela actividade redox de alguns complexos metálicos. No primeiro caso, o composto pode então adquirir capacidade de actuar como agente redutor após ser excitado fotoquimicamente, enquanto no segundo caso a sua acção redutora advém das suas características electroquímicas intrínsecas. Em ambos os casos, pode ocorrer redução do oxigénio molecular, dando origem a radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e estes, por sua vez, reduzidos primeiramente a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e depois a radicais hidroxilo (OH^{\cdot}) (Berg, 2008). Os radicais OH^{\cdot} têm capacidade de reagir com as bases e as pentoses do DNA, induzindo a formação de lesões genotóxicas,

sendo a mais conhecida a oxidação da guanosina a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, que dá origem a transições do tipo G → T (Franco *et al.*, 2008).

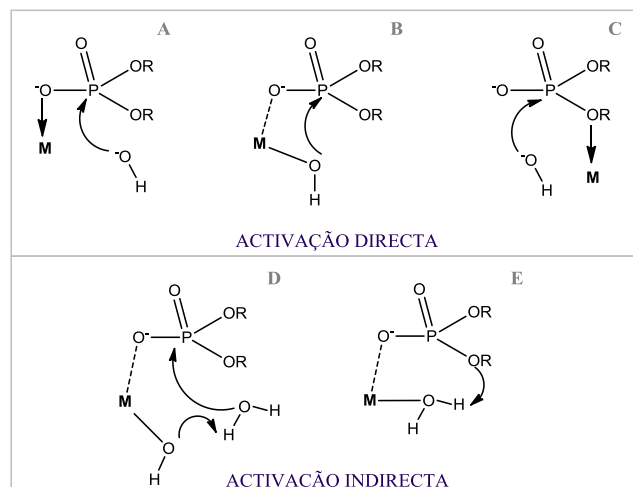


Figura 1.17 – Mecanismos de catálise da hidrólise de ligações fosfodiéster promovida por átomos metálicos. Adaptado de Mancin e Tecilla, 2009 e de Williams *et al.*, 1999.

1.7. RNA E PROTEÍNAS COMO ALVOS CELULARES DE COMPLEXOS METÁLICOS

O DNA, apesar de ser o mais importante, não é o único alvo celular da cisplatina, que actua também ao nível do RNA e das proteínas (Reedjik, 1987). Existem, portanto, outras biomoléculas com as quais os complexos metálicos podem interagir. A abordagem mais comum no que respeita a estratégias antitumorais direccionadas para o RNA é, no entanto, a utilização de cadeias de DNA ou RNA complementares à cadeia de mRNA que codifica para a proteína cuja expressão se pretende suprimir. Dados os fracos resultados obtidos, o interesse relativamente ao RNA de interferência (RNAi), como alternativa, tem aumentado (Nakamoto *et al.*, 2008). Por outro lado, no que respeita a mecanismos de interacção de complexos metálicos com o RNA, existe relativamente pouca informação. O RNA encontra-se geralmente em cadeia simples, mas pode adquirir diversos motivos de estrutura secundária, dos quais são exemplo os *hairpins*, devidos ao emparelhamento interno da cadeia. Pode também ocorrer interacção entre duas moléculas de RNA, dando origem à formação de hélices duplas RNA-RNA em forma A, ou mesmo a estruturas terciárias, especialmente mais complexas (Hermann e Patel, 1999), tornando também o RNA susceptível a mecanismos de intercalação, inserção ou interacção com sulcos. Os complexos metálicos com capacidade de actuar sobre duplexes de ácidos nucleicos (quer DNA ou RNA) podem interactuar também com estruturas não duplexes através dos mesmos mecanismos (Keene *et al.*, 2009).

Quanto à interacção com proteínas, existem vários mecanismos pelos quais os compostos podem exercer actividade citotóxica (figura 1.9). Por exemplo, a inibição da enzima topoisomerase II pode ocorrer por vários mecanismos: (i) pelo bloqueio da ligação da enzima ao DNA, (ii) pela inibição da

ligação de ATP necessária à actividade da enzima e (iii) pela estabilização da ligação não covalente ou covalente da topoisomerase ao DNA. Esta última forma de actuação é aquela que é significativamente mais explorada para fins clínicos (Larsen *et al.*, 2003). Apesar dos compostos maioritariamente associados a este tipo de mecanismos não serem complexos metálicos, Gao e colaboradores (2007) descreveram a inibição da actividade da topoisomerase II por complexos organometálicos de ruténio. Por outro lado, foi também associada a vários complexos de ruténio contendo ligandos orgânicos a capacidade de inibirem determinadas cinases (Meggers, 2009). Alguns compostos, nomeadamente o paclitaxel, têm capacidade de interferir com a reorganização dos microtúbulos durante a mitose por estabilizarem os polímeros de tubulina, dado que a sua afinidade para estes é muito superior à que apresentam para a tubulina solúvel (Brown *et al.*, 2008). Um precursor do paclitaxel, sem capacidade significativa de afectar a viabilidade celular, apresentou capacidade anti-tumoral relativamente a células de cancro de mama humano (MCF-7) após complexação com cobre (Murugkar *et al.*, 1999), demonstrando a potencialidade terapêutica dos complexos metálicos.

1.8. COMPLEXOS ORGANOMETÁLICOS EM ESTUDO

Os complexos utilizados no presente estudo, bem como os respectivos ligandos, foram sintetizados no Grupo V do Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa (Dra. Telma Silva, Professora Doutora Luísa Martins e Professor Doutor Armando Pombeiro). A caracterização estrutural por cristalografia de Raios-X encontra-se presentemente em curso, mas os dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) forneceram informação acerca das ligações entre os ligandos e o catião metálico central, permitindo determinar, por exemplo, que os átomos dadores no caso das moléculas de 1,10-fenantrolina-5,6-diona são os de azoto em detrimento dos de oxigénio. Para conhecer a estrutura exacta dos compostos será no entanto necessário aguardar pelos resultados de cristalografia de Raios-X.

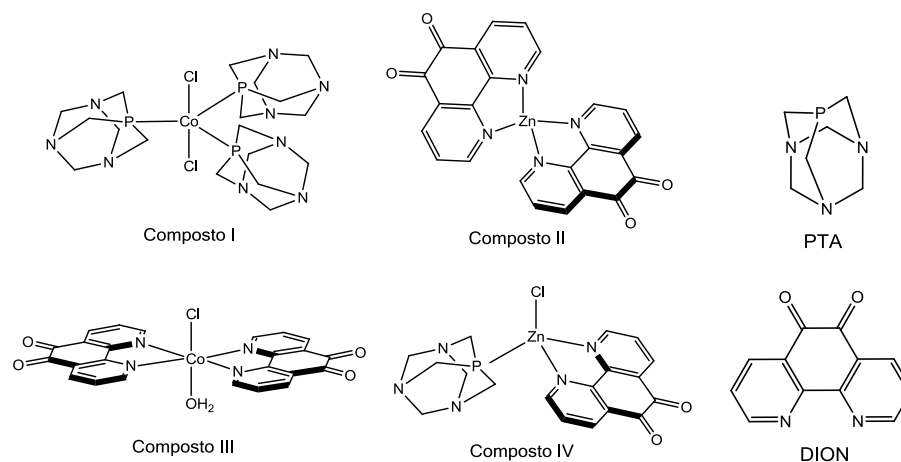


Figura 1.18 – Estrutura química dos complexos organometálicos utilizados no presente estudo, $[\text{Co}(\text{PTA})_3\text{Cl}_2]$ (composto I), $[\text{Zn}(\text{DION})_2]\text{Cl}_2$ (composto II), $[\text{Co}(\text{DION})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BF}_4$ (composto III) e $[\text{Zn}(\text{DION})(\text{PTA})\text{Cl}]\text{BF}_4$ (composto IV), e dos ligandos 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona (DION).

Quanto às suas características, todos os complexos são mononucleares, com Zinco (II) e Cobalto (II) como átomos metálicos centrais (Figura 1.18). Relativamente aos ligandos, apenas o composto II é homoléptico, ou seja, no qual existe apenas um único tipo de ligando, a 1,10-fenantroline-5,6-diona (DION) (figura 1.18). Contrariamente, os compostos I, III e IV são heterolépticos apresentando também cloro (compostos I, III e IV), água (composto III) e 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA) (compostos I e IV) como ligandos, além de DION (figura 1.18). O DION é o único ligando bidentado presente, sendo todos os restantes monodentados.

Os metais escolhidos foram já descritos como tendo capacidade de potenciar a apoptose. A análise dos níveis de zinco em células da próstata saudáveis e tumorais indica uma maior concentração nas primeiras, sendo a acumulação de zinco prevenida nas células tumorais através do silenciamento do transportador de zinco (*ZIP1*) (Fraklin e Costello, 2007). Desta forma, os efeitos metabólicos e bioenergéticos do zinco deverão ser incompatíveis com a aquisição das características das células tumorais, podendo este potenciar a via apoptótica intrínseca através da promoção (1) da transcrição de *BAX*, por activação de elementos resposta do respectivo promotor, e (2) da inserção/ancoragem da proteína Bax na membrana mitocondrial externa para a formação de poros, que permitem a difusão de citocromo C para o citoplasma (Figura 1.19) (Fraklin e Costello, 2007).

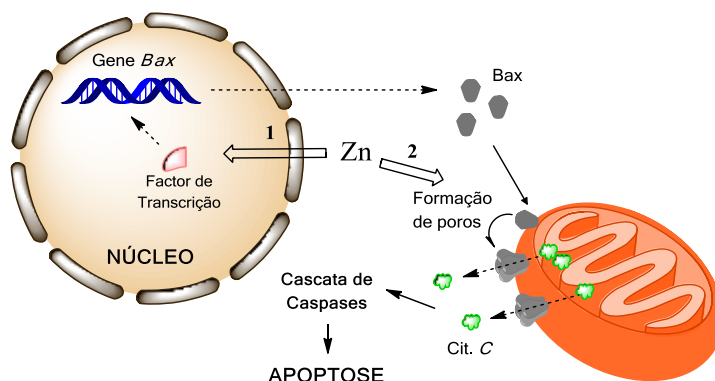


Figura 1.19 – Mecanismos de acção pro-apoptótica do zinco. Adaptado de Fraklin e Costello, 2007.

Um estudo acerca do efeito do zinco sobre o cancro do esófago em ratos mostrou também que a reposição dos níveis de zinco induz apoptose em células do esófago, revertendo o efeito da proliferação aumentada causada pela deficiência em zinco e reduzindo significativamente o desenvolvimento de cancro do esófago (Fong *et al.*, 2001). Além disso, os níveis de zinco em hepatocarcinomas são acentuadamente mais baixos comparativamente ao tecido saudável que os rodeia (Liaw *et al.*, 1997). O zinco tem capacidade de induzir a expressão de metalotioneínas, que actuam como sequestradores de radicais OH^\bullet (Higdon e Ho, 2005), além do seu papel como cofactor de duas isoformas humanas da enzima Superóxido Dismutase (codificadas pelos genes *SOD1* e *SOD3*), que protegem as células da presença de ROS, em particular do efeito do anião $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Zelko *et al.*, 2002). Ainda relativamente ao seu papel na protecção contra o stress oxidativo, o zinco parece prevenir a oxidação de grupos tiol presentes

em proteínas (Gibbs *et al.*, 1985), bem como a formação de radicais OH^\bullet por competição com o ferro e o cobre na reacção de Fenton (Higdon e Ho, 2005).

Relativamente ao cobalto, num estudo acerca do efeito destes iões metálicos sobre os níveis de expressão de proteínas envolvidas na via apoptótica intrínseca, os autores determinaram que o cobalto tem capacidade de induzir apoptose em macrófagos humanos. Mais concretamente, os iões Co^{2+} inibem a expressão de Bcl-2, uma proteína antiapoptótica, e estimulam a expressão de Bax e do fragmento activo da caspase 3, ambas proteínas que promovem a morte celular programada (Petit *et al.*, 2004).

No que respeita aos ligandos, a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (DION), derivada da 1,10-fenantrolina, foi já foi reportada como tendo capacidade de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans*, introduzindo quebras não específicas no DNA (McCann *et al.*, 2004). Além disso, apesar de parecer não apresentar selectividade para células tumorais, afectando aproximadamente células neoplásicas¹ e saudáveis² na mesma extensão, é bastante mais citotóxico que a cisplatina relativamente às quatro linhas celulares referidas no estudo e tem capacidade de inibir a síntese de DNA por um mecanismo que se pensa ser independente da intercalação (Deegan *et al.*, 2006). Foi também já reportada actividade anti-tumoral de complexos de ruténio contendo o outro ligando em estudo, 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA), em células derivadas de adenocarcinoma espontâneo da mama (TS/A) (Scolaro *et al.*, 2007) e também a sua capacidade de interagir com o DNA (Allardyce *et al.*, 2001). Complexos de ouro contendo este mesmo ligando foram também descritos como tendo actividade anti-tumoral em linhas celulares de cancro do ovário humano (A2780) (Vergara *et al.*, 2010).

Relativamente a estudos com complexos semelhantes aos utilizados no presente trabalho, destaca-se o complexo $[\text{Zn}(\text{phen})(\text{DION})\text{Cl}]^+$, similar ao composto II, estudado por Yuan e colaboradores (2006). Estes autores sugerem a intercalação como forma de ligação ao DNA e calcularam uma constante de ligação de $2,4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. Além disso, verificaram que o composto tem capacidade de clivar DNA plasmídico a valores de pH e temperatura fisiológicos. Ghosh e colaboradores (2006) estudaram um complexo similar ao composto III, $[\text{Co}(\text{DION})_2\text{Cl}_2]^+$, e concluíram que se liga covalentemente ao DNA, que poderá interagir com o sulco maior e que sob irradiação apresenta capacidade de clivar DNA em condições aeróbias.

1.9. CARCINOMA HEPATOCELULAR E CARCINOMA COLORECTAL

A actividade anti-tumoral dos complexos organometálicos em estudo será avaliada nas linhas celulares HCT116 e HepG2, correspondentes aos carcinomas colorectal e hepatocelular humanos, respectivamente. São ambos tumores sólidos, pelo que, de acordo com Vogelstein e Kinzler (2004), deverão ter a sua origem em pelo menos três mutações que afectem vias de sinalização intracelular críticas. Além disso, dado tratarem-se ambos de carcinomas, as células possuem já desenvolvidas

¹ Carcinoma renal humano (A-498) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2)

² Hepatócitos humanos (CHANG) e células epiteliais do túbulo proximal renal (KK-2)

características malignas, abordadas anteriormente. Em cerca de 90% dos carcinomas hepatocelulares (HCC), a actividade telomerase encontra-se aumentada por amplificação do gene TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), por integração de DNA do vírus da Hepatite B no locus TERC (*Telomerase RNA Component*) ou por perda da região que codifica para um repressor da telomerase (cromossoma 10p15.1) (Llovet e Bruix, 2008; Nishimoto *et al.*, 2001). As inflamações pelos vírus da Hepatite B e C aumentam o risco de desenvolvimento deste tipo de cancro, como referido na secção 1.1. Além disso, o consumo crónico de álcool desencadeia danos no metabolismo hepático que resultam no desenvolvimento de cirrose hepática, factor de risco relativamente ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Marrero *et al.*, 2005). Relativamente aos factores de risco de cancro colorectal, incluem-se a obesidade, inactividade física, dietas ricas em carnes vermelhas e carnes processadas, consumo crónico de álcool, doenças inflamatórias intestinais e hereditariedade associada à polipose adenomatosa familiar e à variante não-polipósica (American Cancer Society, 2010).

A incidência destes dois tipos de cancro, bem como a mortalidade associada, encontram-se representadas na figura 1.2, onde se pode verificar a maior frequência do cancro colorectal comparativamente ao do fígado, mas também a existência de uma terapêutica mais eficaz para o tratamento do primeiro. De facto, e apesar dos pacientes com hepatocarcinoma em estadios iniciais poderem ser alvo de uma terapia potencialmente curativa, como a ressecção do tumor ou o transplante, não existe ainda uma terapia eficaz no tratamento de estadios mais avançados da doença, cuja incidência tem vindo a aumentar nos EUA e na Europa (Llovet *et al.*, 2008). Os tumores que não podem ser removidos cirurgicamente podem ser alvo de ablação, embolização ou quimioterapia (American Cancer Society, 2010). De facto, a taxa de detecção precoce é baixa e a maioria dos pacientes afectados em estados inoperáveis é sujeita a quimioterapia (Manov *et al.*, 2011). Sorafenib é, desde 2007, o fármaco padrão utilizado para o tratamento das formas avançadas de HCC (Boschetti *et al.*, 2010).

A remoção cirúrgica dos tumores colorectais, por outro lado, é potencialmente curativa nos casos em que existe um baixo grau de invasão do tecido que envolve o foco primário, sendo aplicada quimioterapia, associada ou não a radioterapia, na maioria dos restantes casos, como aqueles em que houve invasão dos nódulos linfáticos (American Cancer Society, 2010). Em termos de quimioterapia, os fármacos utilizados na primeira linha de tratamento incluem fluorouracilo conjugado com leucovorina e irinotecano ou oxaliplatina, quer isoladamente quer em combinação com bevacizumab (Cutsem *et al.*, 2009).

1.10. LEVEDURA COMO ORGANISMO EUCARIOTA MODELO

Dada a grande complexidade genética e bioquímica do ser humano, organismos modelo eucariotas menos complexos mostram-se extremamente úteis ao estudo de doenças humanas. A utilização destes organismos torna-se possível devido à partilha de vários processos bioquímicos e genéticos fundamentais, e logo altamente conservados, entre o ser humano e estes. Dos organismos modelo mais utilizados em genética destacam-se as leveduras, sendo as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e

Schizosaccharomyces pombe as mais comumente utilizadas (Fridovich-Keil, 2005). O conhecimento acerca destes organismos deve-se em grande parte ao facto de terem um grande impacto na indústria biotecnológica. *S. cerevisiae*, em particular, é a levedura mais estudada e explorada (Walker, 2004). O grande interesse em seu torno conduziu à sequenciação completa do seu genoma, que se tornou disponível para consulta em bases de dados públicas a partir de 1996 e que se deveu a uma colaboração a nível mundial, entre cientistas europeus, japoneses e norte-americanos (Goffeau *et al.*, 1996). A comparação entre o genoma humano e o genoma de *S. cerevisiae* permitiu verificar que, dos genes humanos envolvidos em doenças, conhecidos, pelo menos 40 % tem ortólogos na levedura (Oliver, 2002).

A monitorização do crescimento de *S. cerevisiae* na presença de cada um dos compostos é utilizada para estudar o grau de afectação do tempo de divisão e da proliferação celular e permite também verificar se as células se conseguem adaptar à presença dos compostos. A análise do proteoma permite, por outro lado, avaliar possíveis alvos celulares e componentes de mecanismos de adaptação; principalmente proteínas mas também outras biomoléculas cuja indução de danos conduz a alterações na expressão de determinadas proteínas (como por exemplo enzimas de resposta a stress oxidativo). Assim, torna-se possível avaliar o potencial toxicológico de compostos químicos por análise da resposta adaptativa das células de *S. cerevisiae* à sua presença (Santos *et al.*, 2009; Texeira *et al.*, 2005). A utilização da levedura facilita a confirmação futura do envolvimento dos produtos de expressão de determinados genes como alvos dos compostos ou como componentes dos mecanismos de adaptação. Tal é possível através da utilização de mutantes de eliminação, dada a maior facilidade de manipulação genética associada à levedura comparativamente às células humanas (Bjornsti, 2002). Por exemplo, o alvo celular da rapamicina, utilizada para evitar a rejeição de tecidos transplantados, sendo portanto um composto com elevado interesse clínico, foi inicialmente detectado em levedura (Heitman *et al.*, 1991) e só posteriormente validado em células humanas (Schreiber e Crabtree, 1992).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. COMPOSTOS EM ESTUDO

Os complexos organometálicos utilizados, bem como os ligandos DION e PTA foram dissolvidos em água e aliquotados, sendo as alíquotas armazenadas a -20 °C até à sua utilização. As suas massas moleculares, necessárias ao cálculo das concentrações das soluções *stock*, encontram-se indicadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Fórmulas químicas e informação necessária à preparação das soluções *stock* para os complexo organometálico e os ligandos (PTA e DION).

COMPOSTO	FÓRMULA QUÍMICA	MASSA MOLECULAR (g. mol ⁻¹)	SOLVENTE
I	CoC ₁₈ H ₃₆ N ₉ P ₃ Cl ₆	601,3	H ₂ O
II	ZnC ₂₄ H ₁₂ N ₄ O ₄ Cl ₂	617,9	H ₂ O
III	CoC ₂₄ H ₁₄ N ₄ O ₅ BF ₄	619,6	H ₂ O
IV	ZnClC ₁₈ H ₁₈ N ₅ O ₂ PBF ₄	553,0	H ₂ O
DION	C ₁₂ H ₆ N ₂ O ₂	210,2	H ₂ O
PTA	C ₆ H ₁₂ N ₃ P	157,2	H ₂ O

2.2. ESTUDOS EM LINHAS CELULARES HCT116 E HEPG2

Os ensaios de viabilidade celular em linhas tumorais foram efectuados no Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, ao abrigo de um protocolo de cooperação com a Professora Doutora Cecília Rodrigues, e posteriormente no Laboratório de Biodiversidade, Biotecnologia e Biomedicina da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

As linhas tumorais HCT116 (Carcinoma Colorectal Humano) e HepG2 (Carcinoma Hepatocelular Humano) utilizadas, gentilmente cedidas pela Professora Doutora Cecília Rodrigues, são provenientes respectivamente (i) de um carcinoma colorectal presente num indivíduo adulto do sexo masculino e (ii) do tecido hepático de um indivíduo do sexo masculino de 15 anos com um carcinoma hepatocelular diferenciado. Ambas são linhas celulares aderentes. (www.ATCC.org)

2.2.1. MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES

As linhas celulares utilizadas, HCT116 e HepG2, foram cultivadas em meio completo: meio *DMEM* (Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10 % (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) (Invitrogen, New York, EUA) e 1 % (v/v) de antibiótico/antimicótico *Pen-Step+Antimycotic*, (Invitrogen, New York, EUA). O meio de cultura da linha celular HepG2 foi também suplementado com 1 % (v/v) de solução de

aminoácidos *MEM Non Essential Amino Acids* 100x (Invitrogen, New York, EUA). As células foram incubadas em frascos de tampa ventilada BD Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, New Jersey, EUA), numa estufa *Cell 150i* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a 37 °C e 5 % (v/v) CO₂. A renovação semanal das culturas realizou-se ao serem atingidas confluências entre 65 e 80 %, altura em que se aspirou todo o meio de cultura e se adicionaram 5 mL de tripsina (Invitrogen, New York, EUA). A cultura foi incubada a 37 °C e 5 % (v/v) CO₂ durante 5 minutos, para que as células perdessem a aderência à base do frasco. Adicionaram-se 5 mL de meio completo para neutralizar a tripsina e, após aspiração de toda a cultura, esta foi de seguida centrifugada (500 g, 5 minutos, 25 °C) numa centrífuga *5810R* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de meio completo e adicionaram-se, a 50 µL de suspensão celular, 20 mL de meio completo e incubou-se nas condições atrás referidas.

2.2.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para os ensaios de viabilidade, efectuados em triplicado, determinou-se primeiramente a concentração de células viáveis através de contagem em hemocítmetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha), aplicando o método de exclusão de azul de *Trypan*. Este corante apenas penetra em células com a membrana plasmática danificada, permitindo distinguir as células viáveis, que não o incorporam. Para a contagem, adicionaram-se 100 µL de azul *Trypan* 0,1 % (p/v) (Sigma, Missouri, EUA) e 350 µL de meio completo a 50 µL de uma suspensão celular preparada como descrito no ponto 2.2.1. O número de células por mililitro foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ Células}}{\text{mL}} = \frac{\sum N^{\circ} \text{ Células Quadrantes 1 a 4}}{4} \cdot 10^4 \cdot (\text{Volume Câmara em mm}^3) \cdot \text{Factor de Diluição} \quad (1)$$

A partir da concentração de células viáveis, calculou-se o volume de suspensão celular necessário para preparar uma solução com 5000 células mL⁻¹. Desta suspensão, foram distribuídos 100 µL pelos vários poços de uma placa de 96 poços de fundo plano (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) (nº de poços dependente do nº de compostos e diluições em estudo). Incubou-se a placa a 37°C e 5% (v/v) CO₂ durante 24 h e observou-se a placa num microscópio invertido para avaliar o aspecto das células e a confluência, que deverá ser aproximadamente 80 %. Prepararam-se as soluções dos compostos I-IV e de doxorrubicina a várias concentrações, de 0 a 200 µM, em meio de cultura. Aspirou-se o meio de cultura de cada poço da placa e adicionaram-se (i) 100 µL de meio de cultura fresco aos poços definidos para o controlo das condições de crescimento e (ii) 100 µL de uma solução de água e meio de cultura aos poços utilizados para o controlo do solvente. Esta última solução foi preparada com um volume de água igual ao maior volume de composto utilizado na preparação das soluções. Adicionaram-se a cada um dos restantes poços 100 µL de cada uma das soluções preparadas para cada composto, dispostas na placa da mais diluída para a mais concentrada e em duplicado. Incubou-se a placa a 37 °C e 5 % (v/v) CO₂ durante 48 h, aspirou-se o meio e adicionaram-se, a cada poço, 100 µL de uma solução de MTS ((3-(4,5-

dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)/PMS (metossulfato de fenazina), na proporção 100 (meio completo):20MTS:1PMS. Esta solução foi preparada de acordo com as instruções do kit utilizado, *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, Fitchburg, EUA), que pressupõe ser um método colorimétrico que se baseia na determinação do nº de células viáveis, capazes de converter MTS a formazano. A placa foi incubada a 37 °C e 5 % (v/v) CO₂ durante 30 minutos e leu-se a absorvância a 490 nm num leitor de microplacas Microplate Reader Mod. 680 (BioRad, California, EUA). A viabilidade celular (%) foi determinada através dos valores de absorvância através da seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{490}(amostra)}{Abs_{490}(controlo)} \cdot 100 \quad (2)$$

Repetiu-se o procedimento utilizando concentrações superiores do composto I (100-2000 µM) e utilizando os ligandos DION (2-80 µM) e PTA (500-6000 µM), até se verificar uma diminuição significativa da viabilidade.

2.2.3. ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA NUCLEAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA: MARCAÇÃO COM *HOECHST 33258*

Prepararam-se culturas das linhas tumorais HCT116 em placas de 35 mm (Orange Scientific), ajustando a concentração celular para 1500 células mL⁻¹, determinada pelo método de exclusão de azul Trypan descrito na secção anterior. Incubaram-se as placas a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ durante 24 h, aspirou-se o meio e adicionaram-se, a cada placa, 2 mL de soluções dos compostos em estudo em meio completo (0,5 µM doxorrubicina, 2,5 µM compostos II e III, 10 µM composto IV e 2,5 µM DION) e 2 mL de meio de cultura à placa controlo. Incubaram-se as placas a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ durante 48 h, aspirou-se o meio e lavaram-se as células três vezes com 1 mL de PBS 1X (Invitrogen, New York, EUA). Adicionou-se, de seguida, 1 mL de paraformaldeído 4 % (v/v) em PBS 1X e incubaram-se as placas durante 10 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Lavaram-se novamente as células três vezes com 1 mL de PBS 1X. Adicionou-se 1 mL de solução de *Hoechst 33258* (Sigma) a 5 µg mL⁻¹ a cada placa e incubaram-se as placas, uma vez mais, ao abrigo da luz durante 10 minutos à temperatura ambiente. Lavaram-se as placas três vezes com PBS 1X e adicionaram-se 20 µL de uma solução PBS 1X:glicerol na proporção 3:1 no centro de cada placa, sobre os quais se colocou uma lamela. A fluorescência emitida pelas células foi observada e registada num microscópio Olympus BX51 com unidade de fluorescência U-RFL-T (filtro U-MWU2) e máquina DP50 acoplada (Olympus, Tóquio, Japão), utilizando o *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus, Tóquio, Japão). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.4. ENSAIO DE DETECÇÃO DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Estes ensaios foram efectuados com base num protocolo de colaboração com a Professora Doutora Paula Videira, Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

Prepararam-se culturas das linhas tumorais HCT116 em placas de 35 mm (Orange Scientific), ajustando a concentração celular para 4000 células mL⁻¹, determinada pelo método de exclusão de azul Trypan descrito na secção 2.1.2. Incubaram-se as placas a 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ durante 24 h, aspirou-se o meio e adicionaram-se, a cada placa, 2 mL de soluções dos compostos em estudo em meio completo (1 µM compostos II e III, 2 µM composto IV e DION e 10 µM ZnCl₂) e 2 mL de meio de cultura à placa controlo. Após 48 h de incubação nas condições referidas, aspirou-se novamente o meio das placas e adicionaram-se 500 µL de tripsina. Após incubação das células (5 minutos, 37 °C, 5 % CO₂) o volume foi completamente transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado (1000 g, 5 minutos, 25 °C). As células foram posteriormente lavadas duas vezes com PBS 1X e procedeu-se à marcação com isotiocianato de fluoresceína conjugado com Anexina e iodeto de acordo com as indicações do fornecedor do Kit *Annexin-V FITC Apoptosis* (Invitrogen New York, EUA). Após a marcação, as amostras foram analisadas num citómetro de fluxo BD FACScalibur™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), existente no laboratório de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, com base num protocolo estabelecido com a Professora Doutora Paula Videira. Os resultados foram analisados através do programa BD Paint a Gate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.3. ESTUDOS EM *S. cerevisiae*

2.3.1. ESTIRPE, MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) foi cultivada a 30°C com agitação orbital (150 rpm) numa incubadora G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Jersey, EUA), em meio MMB, acidificado a pH4 com HCl, com a seguinte composição por litro: 20 g glucose (Scharlau, Barcelona, Espanha), 2,65 g (NH₄)₂SO₄ (VWR, Leuven, Bélgica), 1,7 g *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sem aminoácidos ou NH₄⁺ (Sigma), 20 mg metionina (Sigma), 20 mg histidina (Sigma), 60 mg leucina (Sigma) e 20 mg uracilo (Sigma). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos, à excepção da solução de aminoácidos e de uracilo, preparada separadamente, que foi esterilizada por filtração, com filtro de 0,45 µm de diâmetro de poro (Whatman, Kent, Reino Unido). A estirpe *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 foi mantida em placas de meio sólido YPD com a seguinte composição por litro: 30 g de glucose, 5 g de extracto de levedura (Biokar, Beauvais, França), 10 g de bactopectona (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e 30 g de agar (Merk, Darmstadt, Alemanha). A renovação por repicagem foi realizada semanalmente, seguida de incubação das placas a 30°C durante 48 horas, sendo estas depois armazenadas a 4°C até posterior utilização.

2.3.2. ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE AOS COMPOSTOS EM MEIO LÍQUIDO

A susceptibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 aos compostos antitumorais foi avaliada através da comparação de curvas de crescimento na ausência e presença de cada um dos

compostos em estudo, em meio MMB acidificado a pH 4,0. Os pré-inóculos foram preparados por incubação *overnight* a 30 °C e 150 rpm, de uma colónia proveniente de uma placa fresca de meio YPD sólido (secção 2.3.1). A inoculação dos crescimentos na presença ou ausência dos compostos foi realizada a partir dos pré-inóculos recolhidos em fase exponencial de crescimento (densidade óptica (DO₆₀₀) inicial de 0,100 ± 0,005). Os inóculos foram crescidos em frascos cónicos de 100 mL com um volume líquido de 30 mL de meio MMB. Inicialmente, avaliou-se a susceptibilidade para várias concentrações de cada um dos complexos (5-50 µM). Após este rastreio inicial, escolheram-se as concentrações de compostos para as quais se observaram desvios significativos relativamente à curva de crescimento controlo (designadamente 20 µM dos compostos II e III e 30 µM do composto IV).

O crescimento celular foi monitorizado pela medição da densidade óptica a 600 nm. A taxa específica de crescimento (μ) foi determinada pelo ajuste da zona linear da representação logarítmica da DO₆₀₀ em função do tempo à equação 3 e o tempo de duplicação, ou geração (t_d), calculado através da equação 4.

$$\ln DO_t = \ln DO_0 + \mu \cdot t \quad (3)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

2.3.3. PROTEÓMICA

2.3.3.1. Exposição das células aos compostos e extracção das proteínas

Os inóculos (densidade óptica inicial (DO₆₀₀) de 0,100 ± 0,005) foram crescidos, tal como referido na secção 2.3.2, em frascos cónicos de 500 mL com um volume de meio MMB líquido de 200 mL e de 250 mL com volume líquido de 100 mL para a caracterização, respectivamente, das células em fase de latência e das células em fase exponencial de crescimento. Centrifugaram-se as culturas a 5000 rpm e 4 °C durante 15 minutos ao final de 24 h de incubação (para a caracterização da fase de latência) e após atingirem uma DO₆₀₀ de 1,00 ± 0,05 (fase exponencial – ao final de cerca de 50 h de incubação). O sedimento resultante foi ressuscitado em 2 mL de tampão de lise (9 M Ureia (Sigma) filtrada com filtros de 0,2 µm de diâmetro de poro, 4 % (p/v) CHAPS (3-[(3-cloramidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato) (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 0,5 % (v/v) Tampão *IPG pharmalyte pH 3-10* (GE Healthcare), 15 mM DTT (ditiotretol) (Promega), 43 µL inibidores de proteases *Complete Protease Inhibitor Cocktail ULTRA Tablets* (Roche, Basel, Suíça), 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) (Sigma), vestígios de azul de bromofenol (Sigma). A solução de ureia foi previamente filtrada com filtros de 0,2 µm de diâmetro de poro (Whatman) e o DTT, o PMSF e os inibidores de proteases foram adicionados no momento da utilização. A lise das células foi efectuada por adição de 2 mL de esferas de vidro não lavadas (425-600 µm; Sigma) a cada 2 mL de amostra e posterior incubação durante 30 minutos em ciclos alternados de 1 minuto de agitação em vórtex e de imersão em gelo. Centrifugou-se a 10 000 rpm, 4 °C durante 15 minutos para remoção das esferas de vidros e de detritos celulares. O sobrenadante contendo o extracto total de proteínas foi recuperado e armazenado a -80°C.

2.3.3.2. Precipitação, purificação e quantificação das proteínas

A precipitação das proteínas foi efectuada por adição de 10 µl de uma solução a 2% (p/v) de desoxicolato de sódio (Merck) preparada no momento, por cada mL de extracto proteico. Após agitação no vórtex e incubação a 4°C durante 30 minutos, adicionaram 100 µl de ácido tricloroacético 100% (Panreac, Barcelona, Espanha), por cada mL de extracto, agitou-se no vórtex e incubou-se *overnight* a 4 °C. Centrifugou-se a 13000 rpm, 4°C durante 15 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Inverteram-se os tubos sobre papel absorvente, permanecendo durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sedimento foi de seguida ressuspensão em 140 µL de solução de rehidratação (8 M Ureia, 3% (p/v) CHAPS, 0,5% (v/v) Tampão *IPG pharmalyte pH 3-10*, vestígios de azul de bromofenol (Riedel-de Haën), 4,1 µL de DTT 10% (p/v), 2 µL de PMSF 100 mM e 4,3 µl de inibidores de proteases. A solução de ureia foi previamente filtrada com filtros de 0,2 µm de diâmetro de poro e o DTT, o PMSF e os inibidores de proteases foram adicionados no momento da utilização. Os extractos foram de seguida purificados através do *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare) (de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante) e a cada amostra purificada foram adicionados 125 µL de tampão de rehidratação. Para uma melhor solubilização das proteínas, mantiveram-se as amostras durante 2 h à temperatura ambiente, sendo de seguida centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos para eliminação de proteínas não solubilizadas. Recuperou-se o sobrenadante e efectuou-se a quantificação do teor em proteínas através do *2-D Quant Kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, de forma a calcular o volume correspondente a 125 µg de proteína (para as células recolhidas em fase de latência) e a 300 µg de proteína (para as células recolhidas em fase exponencial, do crescimento). A baixa quantidade de proteína total utilizada para a caracterização do proteoma, em particular na fase de latência, advém do efeito da redução da viabilidade celular na presença dos compostos. A realização deste estudo utilizando volumes superiores de cultura, de forma a obter um maior número de células e por conseguinte maior quantidade de proteína total, não pôde ser realizada pelo facto de os compostos serem sintetizados em baixa quantidade (10 - 20 mg). Relativamente aos extractos proteicos das células recolhidas em fase exponencial de crescimento na presença dos 3 compostos, foram obtidas quantidades de proteína total inferiores a 300 µg. Pelo motivo atrás referido, no que respeita às quantidades limitantes que resultam da síntese de compostos, foram utilizadas as quantidades máximas possíveis de proteína total relativamente a cada extracto obtido: 250, 200 e 150 µg respectivamente para os compostos IV, II e III. Note-se, no entanto, que foram efectuadas as correcções nas variações de expressão com base nos valores de proteína total obtidos nos duplicados dos géis de proteómica.

2.3.3.3. Focagem Isoeléctrica (1ª Dimensão)

Pipetaram-se os volumes de cada uma das amostras, determinados como descrito na secção anterior, para suportes de tiras *7cm IPG strip holder* (GE Healthcare), colocaram-se as tiras *Immobiline Drystrip pH 3-10 NL* de 7cm (GE Healthcare), tendo o cuidado de o gel ficar em contacto com a amostra, e adicionou-

se 1 mL de *Drystrip Cover Fluid* (GE Healthcare). Colocaram-se os suportes, devidamente fechados, numa unidade de focagem *Ettan IPGphor 3 IEF System* (GE Healthcare) e procedeu-se à focagem isoelétrica através do programa apresentado na tabela 2.2.

Tabela 2.2. – Condições utilizadas em cada um dos passos do programa de focagem isoelétrica.

Passo	Duração (h)	Voltagem (V)	Temperatura (°C)
1	12	30	20
2	0,5	100	20
3	0,5	500	20
4	0,5	1000	20
5	1	5000	20

2.3.3.4. Preparação das amostras para a 2ª dimensão

Após a focagem isoelétrica, retiraram-se as tiras dos suportes e colocou-se cada uma delas em 10 mL de uma solução de equilíbrio ((1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Calbiochem), 360,35 g/L ureia (Scharlau), 354 mL/L glicerol 3 0% (v/v) (Panreac), 20 g/L SDS (Riedel-de Haën, Saint Louis, EUA), vestígios de azul de bromofenol) contendo 1 % (p/v) DTT, durante 15 minutos com agitação horizontal. Repetiu-se o procedimento com 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (GE Healthcare) em solução de equilíbrio.

2.3.3.5. Electroforese em Gel de Poliacrilamida (2ª Dimensão)

Para a segunda dimensão, preparou-se um gel de poliacrilamida a 12 % (v/v) (4 mL acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 2,5 mL Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (Calbiochem), 3,5 mL dH₂O, 75 µL APS (persulfato de amónia) (Biorad), 10 µL TEMED (N,N,N'-Tetrametiletilenodiamina) (Sigma)). Colocou-se o gel nos moldes, pertencentes ao sistema *SDS-PAGE Mini-PROTEAN® 3* (Biorad), e selou-se com água. Após cerca de 30 minutos de polimerização removeu-se a água com papel de filtro e colocaram-se as tiras sobre o topo de cada um dos géis. Estes foram seguidamente selados com solução de agarose 0,5 % (p/v) (Lonza) em tampão de electroforese (3,79 g/L tris-base (Calbiochem), 18 g/L glicina (Panreac, Barcelona, Espanha), 1,25 g/L SDS). A electroforese decorreu a 30 volts nos primeiros 30 minutos, seguidos de 90 volts até a frente de migração, demarcada pelo azul de bromofenol, atingir a base do gel.

2.3.3.6. Revelação dos géis

Coraram-se os géis com uma solução de Comassie R350 (usando para tal três pastilhas de *PhasT Gel Blue R* (GE Healthcare)) dissolvidas em 1 L de ácido acético a 10 % (v/v) (Panreac)) aquecida no microondas durante 2 minutos a 900 watts. Removeu-se o excesso de corante com água destilada aquecida pelo mesmo procedimento.

2.3.3.7. Digitalização e análise informática dos géis bidimensionais

Os géis foram digitalizados através de um *scanner Epson Perfection 1200U* e do programa *Epson Scan*

(Epson, Long Beach, EUA).

A análise e comparação dos níveis de expressão foram efectuadas a partir do programa *Melanie 7.05* (Genebio, Genebra, Suíça).

2.3.3.8. Identificação de proteínas por MALDI-TOF

Após a análise dos géis, excisaram-se os *spots* com variações de intensidade (incrementada ou diminuída) consideradas de interesse, correspondentes a proteínas diferencialmente expressas na fase de latência e na fase exponencial do crescimento, na presença dos compostos, em comparação com as células crescidas na ausência desses mesmos compostos. Os *spots* foram armazenados a -80 °C em microtubos de 1,5 mL, até à sua análise. A identificação das proteínas foi efectuada através da técnica *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) / *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry* (MALDI-MS), sendo as proteínas correspondentes à fase de latência e à fase exponencial de crescimento identificadas, respectivamente, pelo Doutor David da Silva, pertencente ao Grupo de Investigação do Doutor Patrick Chaimbault do Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL) da Universidade Paul Verlaine, em Metz, França e pela Doutora Tânia Simões, pertencente ao Grupo de Investigação da Professora Doutora Débora Penque, do Laboratório de Proteómica, Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA-IP), Lisboa, Portugal.

2.4. TITULAÇÕES UV

Para a determinação dos coeficientes de extinção molar relativos aos compostos II, III e IV e à doxorubicina, adquiriram-se os espectros de soluções de cada um destes compostos, a várias concentrações (entre 5 e 90 µM) em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02, na região do UV-visível (entre 230 e 700 nm). Os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-2010PC de feixe duplo (Shimadzu, Kyoto, Japão) e utilizados na determinação dos coeficientes de extinção molar por aplicação da equação

$$A = \varepsilon \cdot \ell \cdot c \quad (5)$$

baseada na lei de Lambert-Beer, em que A corresponde à absorvância, ε ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) ao coeficiente de extinção molar, ℓ (cm) ao percurso óptico e c ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) à concentração da espécie.

De forma a caracterizar a interacção dos compostos II, III e IV e de doxorubicina com o DNA, foi determinada a variação da absorvância dos compostos a 260 nm como resultado da adição de DNA de timo de bezerro. Para o efeito, prepararam-se soluções de cada um dos compostos II, III, IV e de doxorubicina em concentrações de respectivamente 12, 7, 20 e 60 µM, em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. Adquiriram-se os espectros de cada uma das soluções, na ausência e na presença de concentrações crescentes de DNA de timo de bezerro (Invitrogen, New York, EUA), o qual foi adicionado quer às soluções de compostos quer à solução de referência (tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH

7,0).

Para a determinação das constantes de afinidade dos compostos para o DNA, repetiu-se o procedimento anteriormente descrito, com base em espectros resultantes de titulações UV de soluções de cada um dos compostos com uma solução de DNA de timo de bezerro. Utilizaram-se soluções dos compostos II, III e IV e de doxorrubicina com concentrações de 35, 25, 55 e 60 μM , respectivamente determinadas por aplicação da equação 5 e dos coeficientes de extinção molar, determinados para cada composto.

A concentração de DNA por nucleótido foi previamente determinada através da leitura da absorvância a 260 nm num espectrofotómetro *NanoDrop2000* (ThermoScientific, Massachusetts, EUA) e aplicação da equação 3, utilizando um coeficiente de extinção molar de $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Efthimiadou *et al.*, 2010).

Os valores de absorvância obtidos em cada titulação são corrigidos com base na diluição provocada pela adição de solução de DNA através da seguinte fórmula,

$$Abs_{\text{corrigida}} = Abs_{\text{medida}} \cdot \frac{Vol_{\text{Titulado}} + Vol_{\text{Titulante}}}{Vol_{\text{Titulado}}} \quad (6)$$

correspondendo Vol_{Titulado} à solução de composto a ser titulada e $Vol_{\text{Titulante}}$ ao volume total de solução de DNA adicionado ao longo da titulação. As constantes de ligação foram estimadas por aplicação da equação

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (7)$$

onde $[DNA]$ corresponde à concentração de DNA por nucleótido, ϵ_f ao coeficiente de extinção molar dos complexos na sua forma livre, ϵ_b ao coeficiente de extinção molar dos complexos ligados ao DNA, ϵ_A ao coeficiente de extinção molar aparente, dado por $Abs/[Complexo]$, e K_b à constante de ligação (Efthimiadou *et al.*, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5. EXTRACÇÃO DE DNA PLASMÍDICO

Células da estirpe *E. coli* DH5 α transformadas com plasmídeo pBluscript II SK+ (pBSK II) (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) foram cultivadas em meio líquido LB (Applichem, Darmstadt, Alemanha), ao qual foi adicionada ampicilina (Bioline, Londres, Reino Unido) numa concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. O DNA plasmídico foi extraído de culturas de *E. coli* DH5 α , crescidas durante a noite, através do *kit Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (Invitex, Berlim, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, à excepção da eluição, que foi efectuada com tampão 5 mM Tris-HCl (Merk), 50 mM NaCl (Panreac) pH 7,02 pré-aquecido a 70°C. A concentração de DNA plasmídico foi determinada por leitura da absorvância em espectrofotómetro *NanoDrop2000* (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), através da aplicação da equação 5.

O DNA isolado foi quantificado (a concentração de DNA em ng/ μL para cada amostra foi calculada com base na equação 5 atrás descrita) no equipamento *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific,

Massachusetts, EUA), confirmando-se também a sua pureza, através das razões entre a absorvância a 260 nm (A_{260}) e a absorvância a 280 nm (A_{280}) e entre a A_{260} e a absorvância a 230 nm (A_{230}). O pico de absorvância dos ácidos nucleicos é 260 nm, das proteínas 280 nm e de contaminantes como sais e compostos orgânicos 230 nm. Estas razões permitem então avaliar a contaminação de proteínas (razão inferior a 1,8) e de outros compostos (razão inferior a 2). A integridade do DNA foi avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose a 0,8 % (peso/volume; p/v) contendo *GelRed* (Biotarget, representante da Biotium, Portugal; 500 μ L de solução 10.000x concentrada) numa concentração de 2 μ l por cada 100 mL de gel.

2.6. ESTUDOS DE CLIVAGEM DE DNA PLASMÍDICO

O DNA plasmídico pBSK II purificado (200 ng por amostra) foi incubado durante 24 h a 37 °C na presença dos compostos, com concentrações entre 25 e 100 μ M, para um volume reaccional de 20 μ L, em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM pH 7,02. Após a incubação, as amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 0,7 % em tampão TAE a 80 V durante 2 horas (Otero *et al.*, 2007). Os géis foram corados durante 30 minutos numa solução de brometo de etídeo 0,5 μ g mL⁻¹ e seguidamente descorados durante 30 minutos em água destilada (Otero *et al.*, 2007). Os géis foram visualizados num transiluminador *UVIpure* (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) e as imagens adquiridas através de uma câmara DC290 (Kodak, Rochester, EUA), tendo a aquisição de imagem sido feita através do *software* AlphaEaseFC (Alpha Innotech, Kasendorf, Alemanha). A análise por densitometria foi efectuada através do *software* ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.7. ENSAIOS DE RETARDAMENTO DA MOBILIDADE ELECTROFORÉTICA DE PDNA DEPENDENTE DO TEMPO

Incubaram-se 200 ng de DNA plasmídico pBSK II, obtido de acordo com a secção 2.5, com a endonuclease de restrição EcoRI (New England Biolabs, Ipswich, EUA) durante 2 horas a 37 °C, de forma a obter o plasmídeo na forma linear. Incubaram-se 400 ng de pBSK II, em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02 na ausência (controlo negativo) e na presença de 250 μ M de composto III (6 amostras), a 37 °C. A uma das amostras foram imediatamente adicionados 5 μ L tampão de deposição com 25 mM de EDTA para parar a reacção do composto com o DNA (Otero *et al.*, 2007), sendo cada tudo de amostra colocado numa mistura de gelo e etanol. Repetiu-se o procedimento com as restantes amostras em intervalos de 5 minutos (nos primeiros 20 minutos de incubação) e 10 minutos (dos 20 aos 40 minutos de incubação), até à última amostra e ao controlo negativo, ambos com o mesmo tempo de incubação. A electroforese em gel de agarose e a aquisição das imagens foram realizadas de acordo com a secção 2.6. O cálculo dos valores de mobilidade electroforética foi efectuado através do *software* GelAnalyzer (www.gelalyzer.com). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.8. INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS

Este ensaio foi efectuado no Departamento de Genética do CIGMH, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, ao abrigo de um protocolo de colaboração com o Professor Doutor António Sebastião Rodrigues.

2.8.1. CULTURA DE LINHAS CELULARES

As células da linha V79 (fibroblastos pulmonares de *Cricetulus griseus*) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% (v/v) de FBS, em tubos Falcon de 50mL (BD Biosciences) com uma inclinação de 45°, e incubadas a 37 °C, 5% (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. As células foram crescidas durante 16 h na presença do composto III a diferentes concentrações (0,25 µM, 0,5 µM e 1,0 µM) e de Mitomicina C (Sigma) a 1,5 µM. Duas horas antes de terminar o tempo de cultura, adicionou-se a cada tubo 0,1 mL de uma solução de colchicina (4mg/mL) (Sigma) previamente aquecida a 37 °C e homogenizou-se.

2.8.2. CHOQUE HIPOTÓNICO E FIXAÇÃO

No fim das 16h de incubação (ponto 2.8.1), as culturas foram retiradas da estufa, homogeneizadas e centrifugadas (5 min, 1500 rpm). Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se uma solução 0,075 mM KCl (previamente aquecida durante 10 min a 37 °C (8 mL para cada tubo de células)) e colocaram-se os tubos num banho a 37 °C durante 4 min. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur fez-se borbulhar o ar da tetina no fundo dos tubos três vezes, aos 0 min e aos 3 min. Os tubos foram posteriormente centrifugados (5 min, 1500 rpm), tendo-se desprezado o sobrenadante. Adicionaram-se algumas gotas de uma solução metanol/ ácido acético 3:1 (v/v) (solução fixadora) previamente arrefecida a -20 °C, agitando-se rapidamente para evitar a formação de grumos. Juntaram-se 5 mL de solução fixadora, incubou-se durante 15 min a -20 °C, centrifugaram-se os tubos (5 min, 1500 rpm) e desprezaram-se os sobrenadantes. As células foram lavadas com fixador o número de vezes necessário para que o sobrenadante se apresentasse límpido. Os sobrenadantes finais foram ressuspensos em 2 a 3 mL de solução fixadora e armazenados a -20 °C até à sua utilização.

2.8.3. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA OBSERVAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÓMICAS

Utilizando lâminas previamente lavadas e guardadas em água destilada a 4°C, deitaram-se três gotas, a uma altura de cerca de 20 cm, das suspensões celulares preparadas anteriormente sobre lâminas com uma fina camada de água deixando-se secar na horizontal. Após a secagem, colocaram-se as lâminas numa tina de coloração com 4% (p/v) de Giemsa (Sigma) durante 10 min. Lavaram-se as lâminas em água corrente e deixaram-se secar. Colocaram-se 2 gotas de *Entellan* (Merck) sobre as lamelas e inverteram-se as lâminas sobre estas, evitando a formação de bolhas de ar, e deixou-se secar. As preparações foram observadas ao microscópio óptico em campo claro.

2.9. DETECÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A desacetilação e a oxidação da 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato acetil éster (H2DFFDA) (*Molecular Probes: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents* (Invitrogen, New York, EUA)) intracelularmente tem sido usada por vários autores para inferir a presença de espécies reactivas de oxigénio em células eucariotas (Chen e Dickman, 2005; Madeo *et al*, 1999). A desacetilação e oxidação intracelular originam uma forma oxidada fluorescente que pode ser detectada pela monitorização do aumento de fluorescência intracelular com recurso a um microscópio de fluorescência equipado com filtros FITC (Pucéat *et al.*, 2003). Desta forma incubaram-se durante 2 h ou 4 h (30°C, com agitação orbital (150 rpm)) células de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (previamente crescidas em meio líquido MMB na ausência de compostos até ao meio da fase exponencial e recolhidas de forma a apresentarem uma DO_{600} de aproximadamente 0,7 num volume final de 500 μ L) na ausência e na presença de uma solução 8,8 mM de peróxido de hidrogénio (Sigma) (controlo positivo). No tempo zero (para as células incubadas apenas 2 h) ou após 2 h de incubação (para as células sujeitas a 4h de incubação na presença ou ausência de peróxido de hidrogénio) foram adicionados 2 μ L de uma solução de 10 μ g mL^{-1} de 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato acetil éster (mistura de isómeros), reconstituída em etanol absoluto (Riedel-deHaën, Seelze, Alemanha). Após este período de incubação de 2 h ou 4 h as células foram centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos) e o sedimento resultante foi ressuspenso em 25 μ L de tampão MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) 25 mM (Sigma) (Madeo *et al*, 1999). Em simultâneo foram depositados, em lâminas de vidro, 20 μ L de Poli-L-Lisina 0,01 % (Sigma), tendo sido aspirado o volume excedente após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. A cada lâmina tratada foram adicionados 6 μ L de amostra. Observaram-se e fotografaram-se as células em campo claro e em fluorescência, num microscópio Olympus BX51 com unidade de fluorescência U-RFL-T (filtro U-MWB2) e máquina DP50 acoplada (Olympus, Tóquio, Japão), utilizando o *software AnalySIS Soft Imaging System* (Olympus, Tóquio, Japão). Após identificação do tempo ideal para a incubação das células para visualização de ROS, repetiu-se o procedimento em cima descrito incubando as células durante 2 h na ausência de qualquer composto (controlo negativo), com 8,8mM H_2O_2 (controlo positivo) e na presença de 20 μ M de composto II, 20 μ M de composto III, 30 μ M de composto IV ou 30 μ M de DION, em simultâneo com o marcador fluorogénico. As células foram recolhidas, processadas e os resultados observados tal como mencionado acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ENSAIOS EM LINHAS CELULARES NEOPLÁSICAS

Apenas compostos com capacidade de reduzir significativamente a viabilidade de células tumorais apresentarão, à partida, potencial terapêutico, pelo que o estudo do efeito dos compostos sobre a viabilidade celular permite a selecção dos que se evidenciam mais promissores. Por este motivo, foi testada, em primeiro lugar, a actividade anti-tumoral dos quatros complexos organometálicos de zinco e cobalto em duas linhas tumorais: HepG2 e HCT116, respectivamente carcinoma hepatocelular humano e cancro de cólon humano (Figura 3.1).

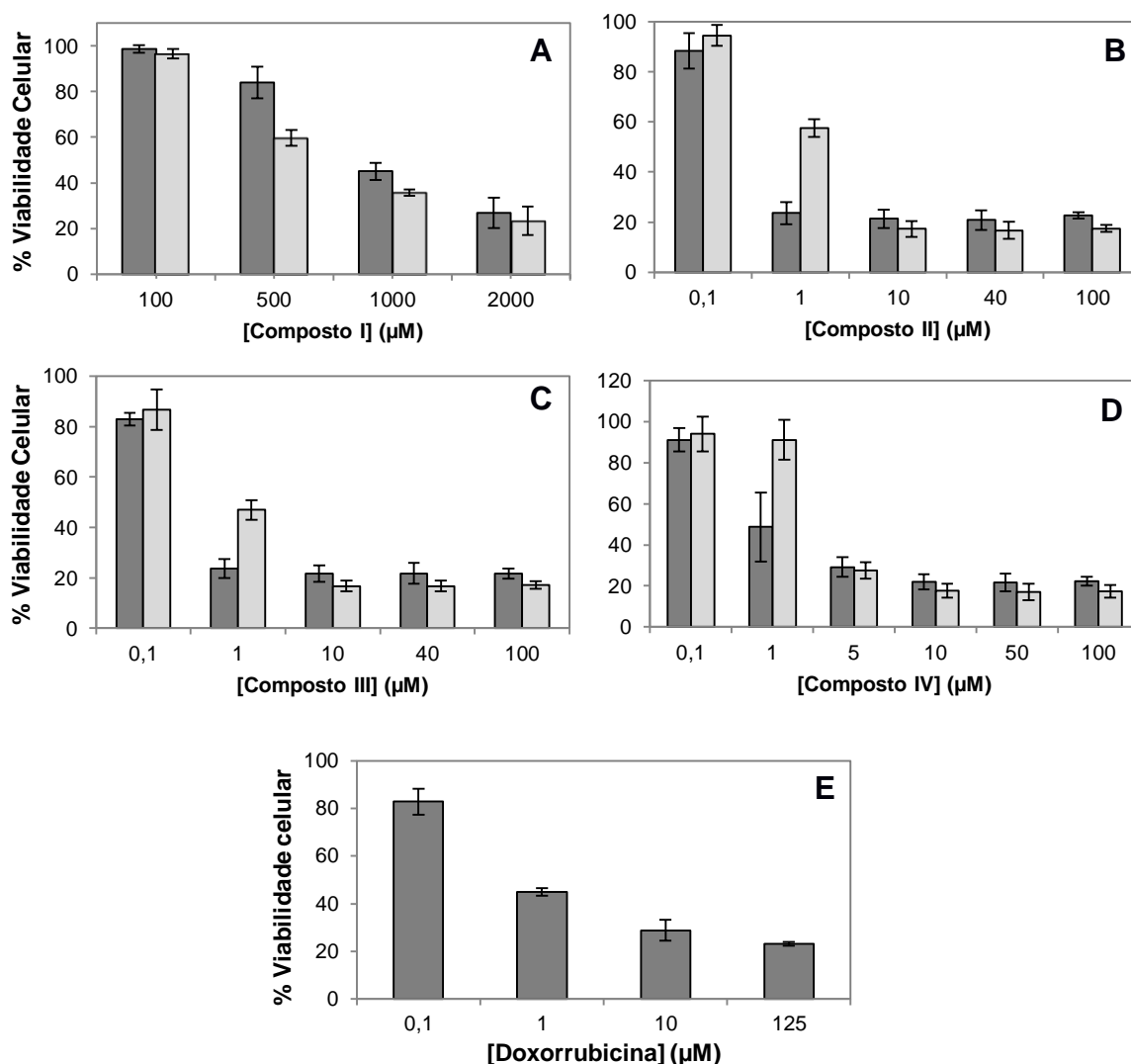


Figura 3.1 – Efeito dos compostos (A) I, (B) II, (C) III, (D) IV e (E) doxorubicina sobre a viabilidade celular das linhas tumorais HCT116 (barras cinza escuro) e HepG2 (barras cinza claro). Em todos os casos verifica-se uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração de composto. Os valores são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão em relação à média.

O complexo I apresenta, para todas as concentrações analisadas, uma maior capacidade de redução da viabilidade das células HepG2, comparativamente à linha HCT116 (Figura 3.1 A). Em contrapartida, para uma concentração de composto II e III de 1 μM , a perda de viabilidade é superior na linha HCT116 (aproximadamente 20 %) (Figura 3.1 B e C, respectivamente) em comparação com a linha HepG2 (a mesma concentração resulta em viabilidades de aproximadamente 60-50%). O composto IV é, à semelhança destes dois últimos, mais activo contra células HCT116 comparativamente às HepG2, mas apresenta actividade inferior à dos compostos II e III. A actividade pode ser quantificada e comparada através da estimativa dos valores de IC_{50} , que consiste na concentração de composto para o qual existe redução da viabilidade celular para metade dos valores controlo (redução em 50%). O complexo I apresenta uma actividade marcadamente inferior comparativamente aos outros complexos em estudo, sendo o respectivo IC_{50} superior a 500 μM para ambas as linhas celulares. Relativamente à linha HCT116, o composto IV apresenta um IC_{50} de aproximadamente 1 μM e os compostos II e III um valor inferior, entre 0,1 e 1 μM . No que respeita à linha HepG2, os compostos II e IV apresentam valores de IC_{50} superiores a 1 μM e o composto III de aproximadamente 1 μM , sendo aquele demonstra maior actividade. De referir que a viabilidade celular atinge um patamar a 20%, que se deve à absorvância residual do MTS mesmo na ausência de células viáveis, como confirmado pelo controlo negativo, apenas com meio de cultura e MTS. Comparativamente à doxorrubicina, com um IC_{50} de aproximadamente 1 μM para a linha celular HCT116, os compostos I e IV apresentam uma actividade inferior, não sendo a diferença muito significativa no caso do composto IV (Figura 3.1 A, D e E). Por outro lado, os compostos II e III apresentam maior capacidade de redução da viabilidade celular que doxorrubicina, sendo um bom indicador do potencial anti-tumoral destes compostos, dada a grande aplicação clínica da doxorrubicina nesse campo (Zhang *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2009).

Globalmente, o composto III é o que apresenta maior actividade, seguindo-se o composto II, o composto IV e, por fim, o composto I (Figura 3.1). A disparidade entre as actividades verificadas para ambos os compostos de cobalto, mas com ligandos diferentes (ver secção 1.8 da introdução), sugere que o metal não se encontre na origem da acção anti-tumoral observada. O mesmo verifica-se mas de forma menos pronunciada na variação entre as actividades dos compostos II e IV, ambos de zinco mas com variação ao nível dos ligandos (ver secção 1.8 da introdução), que é superior à diferença entre as actividades observadas para os compostos II e III, respectivamente de zinco e cobalto mas ambos com duas moléculas de DION na sua coordenação. Por este motivo, os ligandos aparentam exercer um maior efeito sobre a actividade dos complexos que o próprio centro metálico, tendo o DION aparentemente um papel crucial no efeito anti-tumoral observado. De facto, o complexo IV, difere dos demais por não apresentar DION como ligando, e é aquele apresenta menor actividade anti-tumoral. Desta forma, para tentar avaliar a contribuição dos ligandos para a redução da viabilidade celular, foram também avaliadas as capacidades antitumorais intrínsecas do PTA e do DION sobre as mesmas linhas tumorais (Figura 3.2).

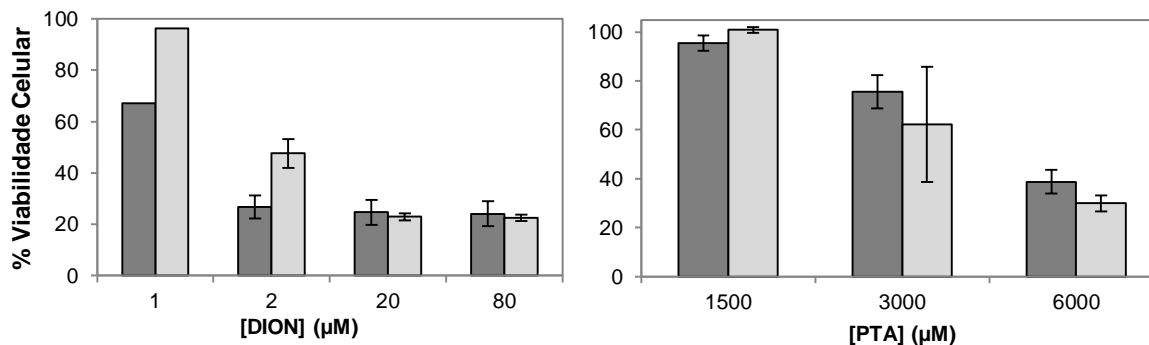


Figura 3.2 – Diminuição da viabilidade celular das linhas tumorais HCT116 (barras cinza escuro) e HepG2 (barras cinza claro) na presença de diferentes concentrações dos ligandos (A) DION e (B) PTA. Os valores são referentes à média de três ensaios independentes e as barras de erro representam o erro padrão em relação à média.

Os resultados obtidos reflectem uma grande disparidade entre as actividades dos dois ligandos, com o DION a apresentar-se substancialmente mais activo que o PTA em ambas as linhas celulares. O valor de IC_{50} para o DION é de aproximadamente 2 µM para a linha HepG2 e inferior a 2 µM para a linha HCT116. O PTA, por outro lado, apresenta para ambas as linhas tumorais valores de IC_{50} superiores a 3000 µM, ou seja, a sua capacidade de reduzir a viabilidade de células neoplásicas não se encontra sequer na mesma ordem de grandeza da observada para o DION. Deegan e colaboradores (2006) testaram o potencial citotóxico do DION e de complexos de prata e cobre contendo este ligando, em células neoplásicas (A-498 e HepG2) e não neoplásicas (HK-2 e CHANG). Os valores de IC_{50} determinados por estes autores para a linha celular HepG2 (0,78 e 0,86 µM para os complexos de cobre e prata, respectivamente e 1,4 µM para o DION) são bastante semelhantes aos obtidos no presente trabalho. De facto, o valor de IC_{50} obtido para o DION encontra-se próximo do dobro dos valores obtido para os complexos, quer no referido estudo, quer no presente trabalho. Como os compostos II e III, à semelhança do complexo de prata testado por Deegan e colaboradores (2006), apresentam duas moléculas de DION como ligandos, para uma dissociação completa de ligandos, o DION apresentar-se-á no dobro da concentração do complexo, podendo justificar a duplicação do valor de IC_{50} .

O DION, bem como compostos de cobre e prata, carregados positivamente, contendo este ligando, foram reportados como tendo actividade de redução da viabilidade celular quer em células não neoplásicas como em neoplásicas (Deegan *et al.*, 2006), indicando que não apresenta selectividade para células tumorais. Teoricamente, a carga positiva dos complexos organometálicos irá favorecer a sua selectividade relativamente a células tumorais, uma vez que estas apresentam potenciais de membrana mais negativos que as células saudáveis, favorecendo a difusão de espécies carregadas positivamente (Modica-Napolitano e Aprille, 2001). No entanto, os resultados obtidos por Deegan e colaboradores (2006) não reflectem este efeito. Apesar disso, é importante confirmar futuramente se existe selectividade para células neoplásicas por parte dos compostos estudados no presente trabalho, uma vez que existe

variação em termos de centros metálicos (Zn, Co) e de alguns ligandos (PTA, Cl e H₂O) entre estes compostos e os estudados pelos referidos autores.

Com base nos resultados dos ensaios de viabilidade celular apresentados, foram escolhidos os compostos com maior actividade antitumoral (complexos II, III e IV e DION) para o prosseguimento dos estudos de caracterização de alvos celulares e mecanismos de acção. Todos estes quatro compostos apresentaram valores de IC₅₀ superiores ao irinotecano, para a linha celular HCT116 (Okumura *et al.*, 2008), e ao sorafenib, para a linha celular HepG2 (Manov *et al.*, 2011), aplicados em quimioterapia no tratamento do cancro colorectal e do carcinoma hepatocelular. Para tentar caracterizar inicialmente a perda de viabilidade induzida por estes compostos, recorreu-se à marcação do DNA das células HCT116 com *Hoescht* 33258, um corante fluorescente que interage com o sulco menor do DNA (Teng *et al.*, 1988) (Figura 3.3). Pela análise da figura 3.3 é possível detectar alterações morfológicas ao nível do núcleo. Uma célula apoptótica corada com *Hoechst* 33258, de acordo com Oberhammer e colaboradores (1993), caracteriza-se por uma intensa fluorescência na periferia do núcleo, resultante de uma condensação perinuclear da cromatina, e núcleos geralmente mais pequenos que os das células viáveis, que se podem dever à transição das células apoptóticas, de uma forma mais plana para uma mais esférica.

Na figura 3.3 (A) é possível observar que as células controlo apresentam uma distribuição relativamente homogénea da fluorescência pelo núcleo, devida à dispersão da cromatina característica das células em interfase. Observam-se ainda algumas células controlo em processo de divisão celular com uma fluorescência ligeiramente superior às restantes, mas que se deve à condensação característica da cromatina durante o processo mitótico. A fragmentação nuclear, alteração morfológica típica da apoptose (Taylor *et al.*, 2008), é visível nas células incubadas com DION e em menor percentagem nas células incubadas com os restantes compostos, incluindo a doxorubicina.

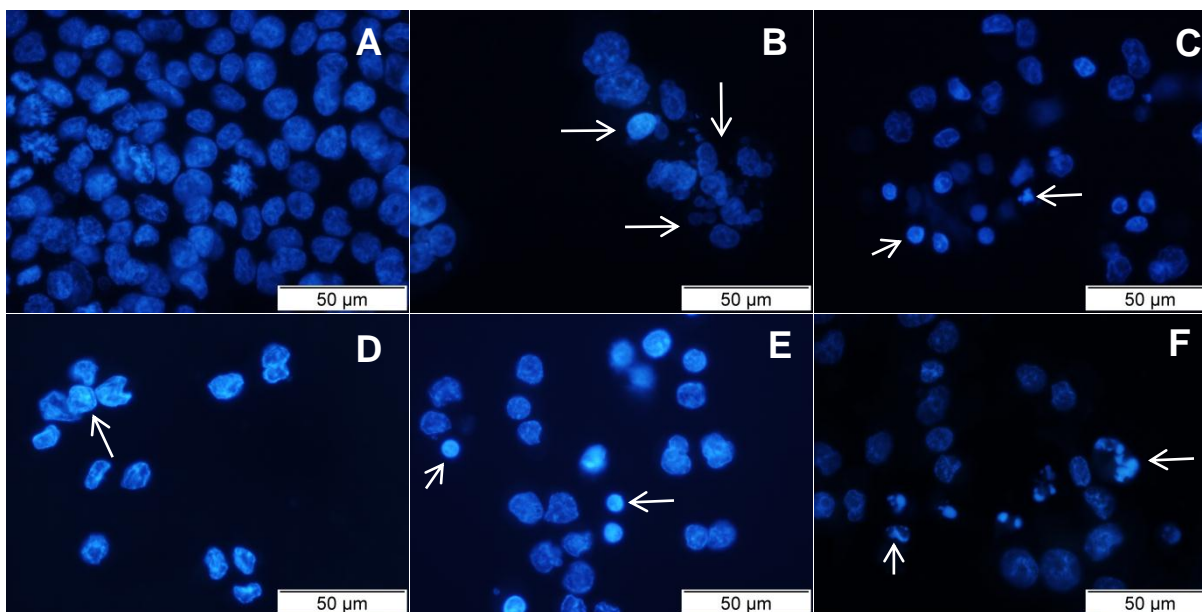


Figura 3.3 – Avaliação da morfologia nuclear e condensação da cromatina, por marcação com *Hoechst* 33258, em células HCT116 controlo (A) e incubadas durante 48 h na presença de (B) 0,5 μM doxorubicina, (C) 2,5 μM

composto II, (D) 2,5 μM composto III, (E) 10 μM composto IV e (F) 2,5 μM DION. As imagens são representativas de três ensaios independentes. (Ampliação de 400x)

Contrariamente, as células expostas aos compostos II, III e IV exibem maioritariamente núcleos de menores dimensões e com maior fluorescência, o que não se verifica nas células expostas a DION (destas, as que não evidenciam fragmentação nuclear apresentam distribuição relativamente uniforme da cromatina). A doxorubicina aparenta também provocar condensação da cromatina mas, no entanto, não se verifica uma diminuição das dimensões nucleares como acontece com os complexos organometálicos. O ensaio de marcação de núcleos com *Hoechst* 33258 sugere então que o DION será o composto com maior capacidade de indução da apoptose, por ser aquele que resulta num maior número de células com fragmentação nuclear. Quanto aos complexos organometálicos, os resultados são menos sugestivos de apoptose, por originarem uma fragmentação nuclear em número substancialmente inferior comparativamente ao DION. Contudo, a compactação nuclear que aparentam induzir é, de acordo com Oberhammer e colaboradores (1993), como já mencionado, uma característica morfológica das células apoptóticas.

Para uma melhor evidência do tipo de morte sofrido pelas células quando expostas a cada um dos compostos, utilizou-se uma marcação dupla da cultura celular HCT116 com os fluorocromos Isotiocinato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), conjugado com Anexina V, e iodeto de propídio (PI). A Anexina V é uma proteína de ligação a fosfolípidos dependente de Ca^{2+} com elevada afinidade para a fosfatidilserina, um fosfolípido translocado da superfície interna da membrana citoplasmática para a externa, em células apoptóticas (Vermes *et al.*, 1995). Assim, a marcação com FITC está dependente da ligação da anexina à fosfatidilserina (PS). Por outro lado, a marcação com iodeto de propídio está associada à permeabilidade da membrana citoplasmática, sendo portanto excluído de células viáveis, cuja membrana intacta impede a sua entrada para o citoplasma, e internalizado por células necróticas devido à perda da integridade da membrana. As células em estadios avançados da apoptose também adquirem danos ao nível da membrana, pelo que se tornam também permeáveis ao iodeto de propídio. Assim, a citometria de fluxo torna possível fazer a distinção entre células viáveis (FITC⁻/PI⁻), células em apoptose em estadios iniciais (FITC⁺/PI⁻), células em apoptose em estadios tardios (FITC⁺/PI⁺) e células em necrose (FITC⁻/PI⁺) (Sawai e Domae, 2011). Os resultados de citometria de fluxo relativos à marcação das culturas expostas aos diferentes compostos, bem como em condições controlo, encontram-se representados na figura 3.4. As células controlo apresentaram-se maioritariamente impermeáveis ao iodeto de propídio e sem marcação com FITC, ou seja, sem externalização da fosfatidilserina, tratando-se portanto de células viáveis. A maioria das células controlo não viáveis apresentava-se em apoptose tardia. Uma vez que ambos os compostos de zinco foram sintetizados a partir de cloreto de zinco, utilizou-se este sal como controlo para verificar que qualquer indução de morte celular não seria desencadeada pelo aumento dos níveis de zinco. De facto, apesar do número de células viáveis ser inferior ao do controlo, não existe uma variação significativa. Além disso, o padrão de distribuição da afectação por tipo de morte celular é bastante idêntico à situação controlo, não sendo significativo o efeito do cloreto de zinco sobre

as células, mesmo sendo utilizada uma concentração bastante superior à dos compostos testados. Tanto no controlo como na presença de cloreto de zinco, além das células não viáveis se apresentarem na sua maioria em apoptose tardia, a marcação com FITC, ou seja, a apoptose em geral, é verificada em aproximadamente 70% das células não viáveis.

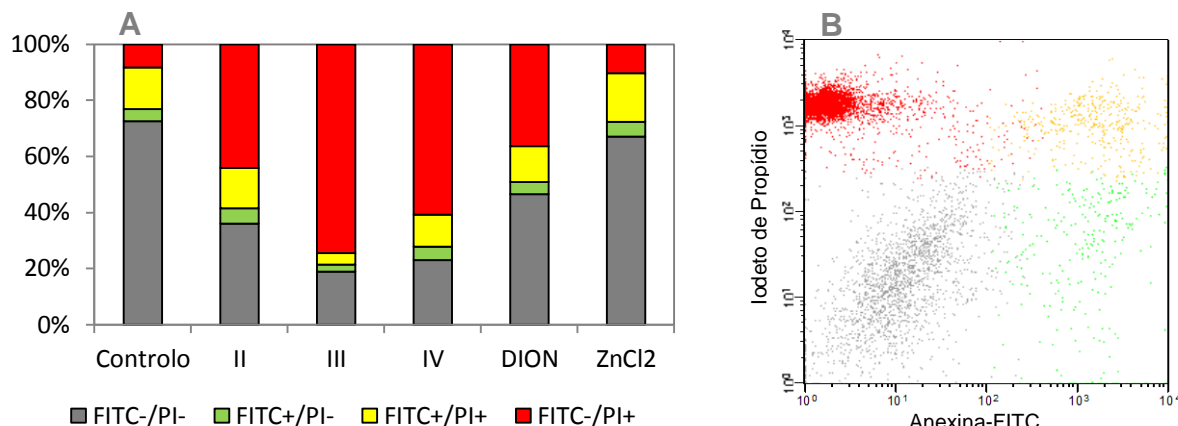


Figura 3.4 – Ensaio de citometria de fluxo para a marcação com Isotiocianato de Fluoresceína, conjugado com Anexina-V, e Iodeto de propídio de células da linha HCT116 incubadas durante 48 horas na presença de 1 μ M dos compostos II e III, de 2 μ M de composto IV e de DION, de 10 μ M de ZnCl₂ e na ausência de qualquer composto. (A) Distribuição, em percentagem, dos quatro tipos de marcação possíveis, nas culturas testadas. Valores referentes à média de três ensaios independentes. (B) Gráfico referente à distribuição dos eventos analisados em termos de intensidade de fluorescência emitida por cada um dos dois fluorocromos utilizados. Gráfico correspondente a cultura incubada com composto III, onde é possível identificar as diferentes populações correspondentes aos quatro tipos de marcação identificadas através de cores, de acordo com o mesmo código utilizado no gráfico A. A identificação das populações e determinação das percentagens relativas a cada uma delas foi efectuada através do programa Paint a Gate, BD Biosciences.

Por sua vez, observa-se um elevado número de células que, na presença dos complexos organometálicos II, III e IV e de DION, apresenta uma elevada permeabilidade para o PI mas que não apresenta marcação com FITC. A incubação na presença de DION resulta num menor número de eventos com marcação do tipo FITC⁻/PI⁺, seguida da incubação com os compostos II, IV e III, respectivamente. No entanto os compostos II e III foram testados a metade da concentração do composto IV e do DION, pelo que, para as mesmas concentrações, o composto II resultaria possivelmente num maior número de eventos com este tipo de marcação do que o verificado para o composto IV. Estes resultados sugerem, portanto, que os complexos organometálicos, bem como o DION, induzem maioritariamente morte celular por necrose. Contudo, foi já reportado relativamente ao complexo de 1,10-fenantrolina [Cu(phen)₂]²⁺ (i) fragmentação internucleossomal do DNA, uma característica tipicamente associada à apoptose (Burkitt *et al.*, 1996; Tsang *et al.*, 1996) e (ii) condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos em células de hepatocarcinoma (Bel-7402), bem como o aumento da proporção de células apoptóticas em ensaios de citometria de fluxo (Zhou *et al.*, 2003).

Coyle e colaboradores (2004) também obtiveram resultados indicativos de apoptose para o complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Não existem, no entanto, até à data da escrita desta tese, quaisquer estudos de avaliação da indução de apoptose em linhas celulares tumorais na presença de DION ou por complexos contendo este ligando. Contudo, a comparação dos resultados obtidos com os disponíveis para os complexos de cobre contendo 1,10-fenantrolina, especialmente $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ dada a sua grande homologia com o composto II, sugere que (i) o cobre possa estar na origem da indução da apoptose ou (ii) os grupos cetona existentes no DION possam participar no mecanismo de acção dos complexos, sendo determinantes no modo como estes induzem morte celular e, aparentemente, favorecendo a necrose.

A indução de necrose é visível não só através da fluorescência emitida pelos fluoróforos utilizados no ensaio como também através da análise da dispersão dos feixes de luz que incidem sobre as células. A dispersão da luz em ângulo reduzido (*forward scatter*) é proporcional às dimensões celulares enquanto a dispersão ortogonal (*side scatter*) é proporcional à sua granulosidade (Dive *et al.*, 1992). Esta informação pode ser aplicada para distinguir entre células não viáveis, detritos celulares e elementos não celulares e células viáveis (Dive *et al.*, 1992). Como é visível na figura 3.5, a cultura controlo, apesar de apresentar eventos de granulosidade e dimensões reduzidas, apresenta uma grande proporção de eventos com valores significativos de dispersão de ângulo reduzido e ortogonal associados a células intactas e maioritariamente viáveis, como é visível através do cruzamento com os dados de fluorescência.

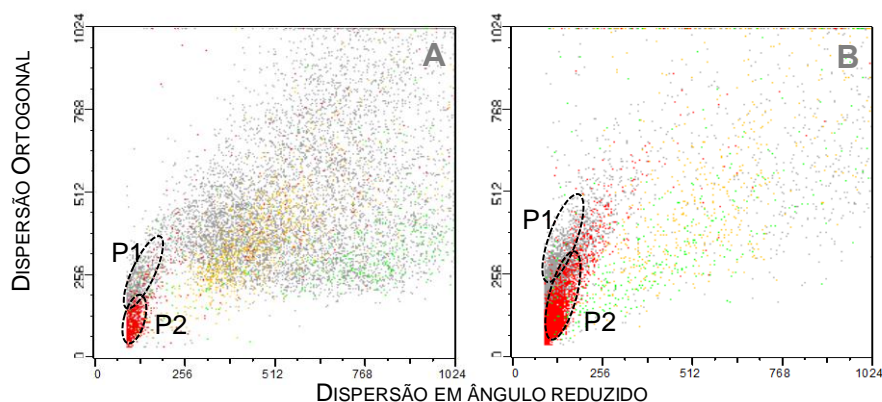


Figura 3.5 – Distribuição dos eventos em termos de dimensões e de granulosidade interna, parâmetros respectivamente proporcionais aos valores de dispersão em ângulo reduzido e dispersão ortogonal. Gráficos obtidos a partir do programa Paint a Gate, BD Biosciences, para células HCT116 (A) controlo e (B) expostas ao composto II, incubadas durante 48 horas.

Por outro lado, as culturas incubadas na presença dos compostos em estudo apresentam um aumento bastante expressivo do número de eventos com reduzida dispersão quer de ângulo reduzido, quer ortogonal, o que, conjuntamente ao aumento da proporção de células com marcação FITC/PI⁺, sugere a necrose como principal forma de morte celular. De facto verifica-se a existência de duas populações com dimensões e granulosidade reduzidas, estando uma delas marcada com iodeto de propídio (Figura 3.5 - P2) e não evidenciando a outra marcação com nenhum dos dois fluorocromos

utilizados (Figura 3.5 – P1). Assim, poderá tratar-se de membranas e outros detritos celulares (população sem marcação) e ácidos nucleicos dispersos em solução (população marcada com iodeto de propídio), resultantes do rebentamento de células necróticas. A necrose é uma forma inflamatória de morte celular (Amaravadi e Thompson, 2007) e a resposta inflamatória associada pode estimular a reincidência do tumor, bem como a resistência à terapia, uma vez que está associada à promoção da neoangiogénese, das capacidades metastáticas, da imuno-supressão local e da instabilidade genómica (Grivennikov *et al.*, 2010). Assim, torna-se importante estudar futuramente o efeito dos compostos sobre outras linhas celulares neoplásicas e não neoplásicas e determinar o tipo de morte induzida em cada uma delas, avaliando se de facto a necrose é a forma mais comum, ou se, por outro lado, os compostos têm capacidade de promover a apoptose, ao contrário do que foi verificado para a linha celular HCT116.

3.2. UTILIZAÇÃO DE *S. cerevisiae* COMO ORGANISMO MODELO EUCARIOTA

Neste trabalho, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* como organismo modelo eucariota para a identificação dos alvos biológicos dos três complexos II, III e IV com actividade anti-tumoral (secção 3.1). Neste sentido, numa fase inicial deste trabalho, realizaram-se crescimentos na presença e na ausência de várias concentrações daqueles compostos, de modo a definirmos para cada um deles, uma concentração que efectivamente afectasse a cinética de crescimento da levedura (efeitos citotóxicos e/ou citoestáticos). Esses resultados encontram-se sumariados na Figura 3.6.

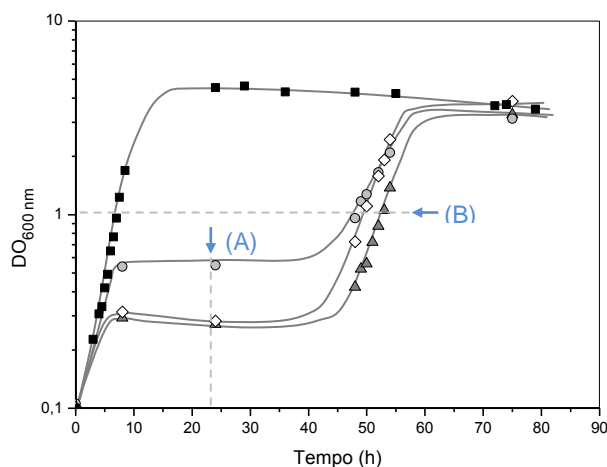


Figura 3.6 – Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 em meio líquido MMB a pH 4,0 (30 °C e 150 rpm) na ausência (■) e na presença de 20 µM de composto II (▲), 20 µM de composto III (●) e de 30 µM de composto IV (◇). Os inóculos foram preparados a partir de culturas em fase exponencial de crescimento ($DO_{600} = 1,0 \pm 0,05$). As letras A e B assinalam respectivamente os eventos de recolha das células em fase de latência e em fase exponencial de crescimento para estudos de proteómica posteriores.

No que respeita à análise dos crescimentos da levedura na presença daqueles compostos podemos constatar que as células inicialmente iniciam o seu crescimento mas que, após oito horas de incubação dá-se início a uma fase de latência. Este comportamento é observado para todos os complexos e sugere que estes possam ter um efeito citostático sobre as células de levedura, impedindo a sua divisão. De facto, foi já reportada capacidade de inibição do crescimento da levedura *Candida albicans* por parte de complexos de 1,10-fenantrolina, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ácido malónico= malH_2) (Coyle *et al.*, 2003; McCann *et al.*, 2000), capazes de introduzir modificações estruturais nas células tais como retracção do citoplasma, fragmentação nuclear e disrupção mitocondrial (Coyle *et al.*, 2004). Além disso, é possível que actividade dos complexos estudados por estes autores seja dependente do ião metálico, dado que existem alterações celulares que não são comuns a todos os compostos: os complexos de cobre e de prata provocaram uma redução dos níveis de ergosterol na membrana celular enquanto a 1,10-fenantrolina e os complexos de cobre e manganês estimularam um aumento do *uptake* de oxigénio (Deegan *et al.*, 2007).

Uma vez que um efeito citotóxico numa parte da população de células acompanhado pela sobrevivência de outra parte da população, em proporções aproximadas, poderia dar origem a uma estabilização da densidade optica, poderão futuramente ser efectuados ensaios de viabilidade em placa, de forma a contabilizar apenas as células viáveis, para confirmar se o efeito associado a estes compostos é de facto citostático.

A eficácia de um composto advém não só da sua reactividade relativamente ao respectivo alvo, mas também da sua capacidade em atingi-lo. Assim, a forma como acede ao interior das células (por difusão ou transporte) condiciona a sua concentração e consequentemente a probabilidade deste interagir com o alvo. A membrana citoplasmática constitui a primeira defesa da célula contra agressões ambientais por separar fisicamente o seu conteúdo do meio que a envolve e portanto terá que ser transposta pelos compostos para que estes possam atingir o meio intracelular. A capacidade inicial de divisão poderá dever-se ao facto dos compostos não terem ainda atingido o seu alvo em quantidade suficiente para que os danos introduzidos sejam suficientes para desencadear a paragem da divisão ou morte celular. A latência induzida pelo composto III é caracterizada por uma maior densidade celular que a induzida pelos restantes dois compostos, o que poderá indicar que este terá maior dificuldade em difundir para o interior das células, em atingir o alvo celular sobre o qual actua ou ainda um mecanismo de actuação sobre o alvo cineticamente mais lento, permitindo uma multiplicação celular inicial mais próxima da observada no controlo.

Esta fase de latência dura aproximadamente 45 horas, altura em que parte da população de células consegue de alguma forma induzir mecanismos de adaptação e resistência aos compostos, iniciando novamente a divisão celular, entrando assim em fase exponencial de crescimento (Figura 3.6). As células adaptadas apresentam, no entanto, uma taxa específica de crescimento (μ) inferior às células controlo em fase exponencial: cerca de duas vezes mais baixa no caso dos complexos de zinco (II e IV) e quase quatro vezes inferior no que respeita ao complexo de cobalto (III) (Figura 3.6 e Tabela 3.1). Assim, para

além do efeito citotóxico ou citostático, observa-se ainda nas células adaptadas uma menor taxa de multiplicação. Contudo, em termos de biomassa final atingida, não existe variação significativa relativamente ao controlo, indicando que as células conseguem reverter o efeito da presença dos complexos e atingir um número de células equivalentes ao existente na ausência de qualquer composto.

Tabela 3.1 – Taxa específica de crescimento (μ) e respectivo tempo de duplicação (t_d) resultantes das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* apresentadas na Figura 3.6

	Controlo	Composto II	Composto III	Composto IV
μ (h^{-1})	0,4066	0,2184	0,1257	0,1979
t_d (h)	1,70 (1h 42m)	3,17 (3h 10m)	5,51 (5h 31m)	3,50 (3h 30m)

De modo a estudar os potenciais alvos biológicos e os mecanismos de resistência induzidos nas células da levedura pela exposição aos complexos organometálicos em estudo, recorreu-se à análise comparativa do proteoma de *S. cerevisiae* na ausência e na presença daqueles três complexos organometálicos. Neste sentido, foram extraídas as proteínas totais de células em fase exponencial do crescimento ($DO_{600} = 1,0 \pm 0,05$) em meio líquido MMB na ausência de compostos (controlo) e em duas fases distintas do crescimento na presença daqueles compostos (fase de latência e fase exponencial). Na tabela 3.2 representam-se os perfis de expressão proteica relativa a células de levedura expostas a cada um dos complexos organometálicos.

Tabela 3.2 – Perfis de expressão proteica de células de *S. cerevisiae*, nas fases de latência e exponencial de crescimento, por exposição aos compostos II (20 μ M), III (20 μ M) e IV (30 μ M). Foram consideradas significativas variações de expressão superiores a 2x. *Os valores de expressão apresentados são a média de dois ensaios independentes e foram calculados usando como linha de base a expressão de cada proteína nos géis controlo.

Designação	Descrição	*Variação de Expressão (Latência/Exponencial) relativa ao controlo		
		Composto II	Composto III	Composto IV
Adh1p	Álcool Desidrogenase	+3,9 / +1,3	+1,7 / +1,9	+2,9 / +1,2
Adk1p	Adenilato Cinase	- / +2,3	- / +2,5	- / +1,7
Dsk2p	Proteína com Domínio de Ubiquitina	- / +2,3	- / +1,6	- / +1,1
Ecm10p/ Sse2p	Proteínas de Choque Térmico	- / +3,2	- / +3,1	- / +2,5
Efb1p	Factor de Alongamento Beta	- / +6,6	- / +10,4	- / +4,6
Eno1p	Enolase I	+1,1 / +1,7	+1,7 / +2,1	-1,5 / 1,0
Eno2p	Enolase II	-2,5 / +1,1	-1,1 / +1,4	-1,5 / +1,1
Fba1p	Frutose 1,6-Bisfosfato Aldolase	-3,3 / +1,4	-3,5 / +1,9	-4,3 / 1,0
Gpm1p	Fosfomutase de Glicerato	-1,7 / -	1,0 / -	-2,2 / -
Hsp60p	Proteína de Choque Térmico	+5,1 / +2,4	+10,3 / +3,1	+9,6 / +2,8
Ilv5p	Acetohidroxiácido Redutoisomerase	-1,2 / - 1,5	-2,2 / -1,3	-1,9 / - 1,6
Ipp1p	Pirofosfatase Inorgânica	-1,5 / -1,1	-2,2 / -1,3	-1,9 / -1,6
Pab1p	Proteína de Ligação a Poli-Adenilato	- / -3,2	- / -2,1	- / -3,4
Pdc1p	Descarboxilase de Piruvato I	-1,2 / -1,2	+2,0 / -1,4	+1,6 / -1,4
Pep4p	Protease de Aspartato	+3,3 / +5,3	+2,6 / +6,0	+7,1 / +2,2
Pgk1p	Cinase de 3-Fosfoglicerato	-2,5 / +1,6	-2,7 / +1,5	-2,7 / +1,2

Sod1p	Dismutase de Superóxido	- / +2,5	- / +2,0	- / +1,3
Ssa1p	Proteína de Choque Térmico	+4,1 / -	+2,0 / -	+10,6 / -
Ssa1p/Ssa2p	Proteínas de Choque Térmico	+11,4 / +1,1	+8,8 / +2,8	+9,3 / +1,6
Ssb1p/Ssb2p	Proteínas de Choque Térmico	+1,5 / +1,7	-2,2 / +2,6	-1,9 / +1,5
Ssc1p	Proteína de Choque Térmico	+2,3 / -	- / -	+1,5 / -
Ssz1p	Proteína de Choque Térmico	- / +2,2	- / +3,7	- / 2,0
Stm1p	Proteína Supressora STM1	- / +2,3	- / +3,3	- / +1,5
Tal1p	Transaldolase	+1,5 / -	+1,5 / -	+1,9 / -
Tdh3p	Desidrogenase de Gliceraldeído-3-Fosfato	-1,9 / +1,5	-1,2 / +4,6	-1,5 / + 1,3
Tpi1p	Isomerase de Trioses Fosfato	- / +1,9	-6,9 / +1,5	- / 1,0
Tsa1p	Tioredoxina Peroxidase	+4,7 / + 2,3	-1,8 / +1,9	+3,9 / +1,8

Na Figura 3.7 podemos observar os géis resultantes da electroforese bidimensional destes extractos proteicos totais, bem como a identificação das proteínas cujo perfil de expressão se apresentou alterado (superior a 2x) em relação ao controlo.

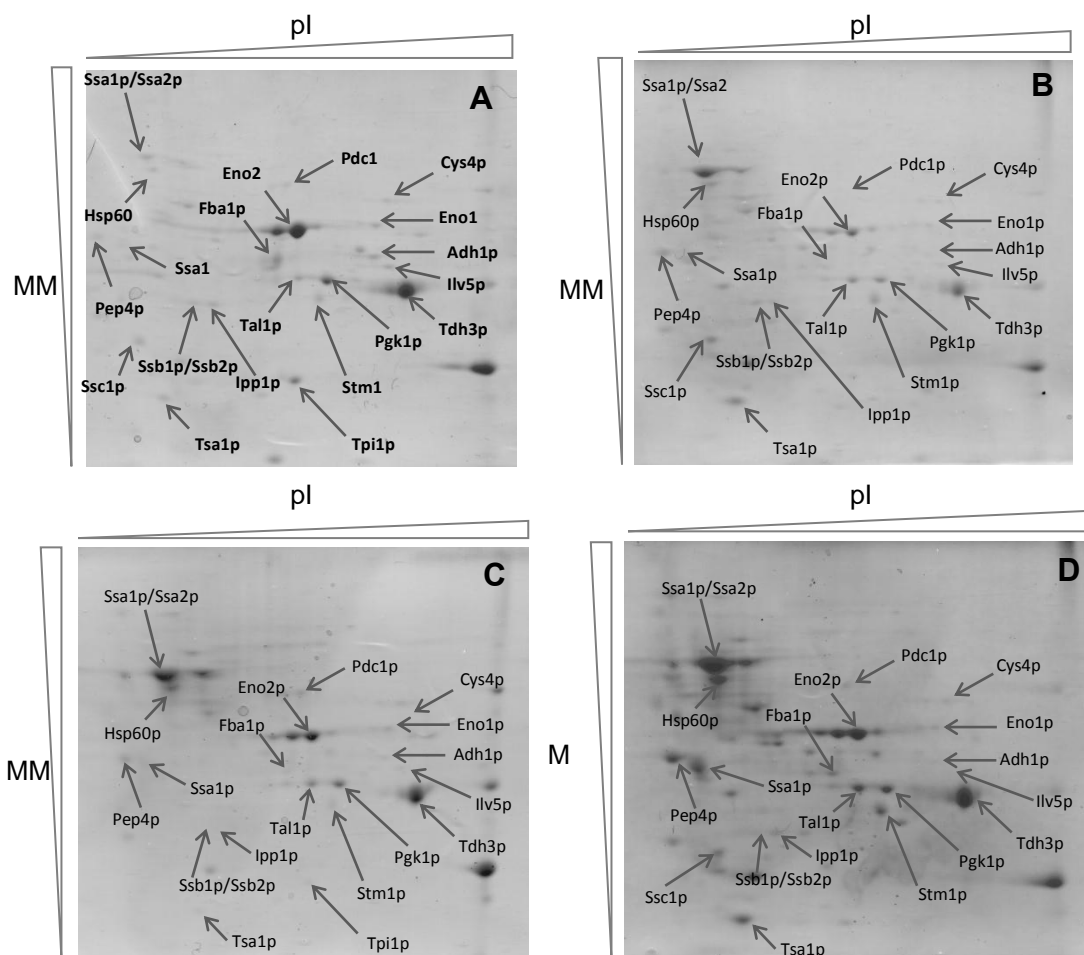


Figura 3.7 – Electroforese bidimensional (2-D) de extractos totais de células de *S. cerevisiae* recolhidas durante (A) fase exponencial ($OD_{600} = 1,0 \pm 0,05$) de um crescimento em meio MMB pH 4,0 na ausência de qualquer composto; e durante a fase de latência (24 h) de um crescimento em meio MMB pH 4,0 suplementado com (B) 20 μ M de composto II, (C) 20 μ M de composto III e (D) 30 μ M de composto IV. As proteínas identificadas com variação de expressão considerada significativa (superior a 2x) entre pelo menos uma das amostras e o controlo encontram-se

assinaladas na figura, associadas ao respectivo *spot*. Estes géis são representativos de todos os géis realizados para as mesmas condições.

De entre as proteínas identificadas com variação de expressão relativamente ao controlo, as enzimas envolvidas na glicólise/gluconeogénese encontram-se todas subexpressas, à excepção da Enolase I, contrariamente à outra isozima que catalisa a mesma reacção. A subexpressão das enzimas glicolíticas é consistente com o efeito citostático evidenciado pelos complexos (Marie e Shinjo, 2011). A divisão celular é reprimida e as células encontram-se metabolicamente menos activas.

Segundo Almeida e colaboradores (2007), as isozimas Tdh2p e Tdh3p são detectadas principalmente em células em crescimento exponencial enquanto a isozima Tdh1p está maioritariamente associada a células em fase estacionária. O facto de uma das isoformas associadas ao crescimento exponencial, Tdh3p, se encontrar subexpressa na presença dos compostos corrobora a acção citostática dos mesmos. Mais, de acordo com McAlister e Holland (1982) a isoforma Eno2p é predominante em células em fase exponencial enquanto os níveis da isozima Eno1p aumentam na fase estacionária. De facto, a expressão de Eno2p é superior na cultura controlo (Figura 3.7) comparativamente às células expostas aos complexos organometálicos, verificando-se a situação inversa no caso da isoforma Eno1p, à excepção da amostra correspondente ao composto IV, onde ambas as isozimas apresentam a mesma variação relativamente ao controlo.

A subexpressão da enzima Ipp1p também reflecte a redução da actividade metabólica das células expostas aos compostos, uma vez que esta enzima catalisa a hidrólise do pirofosfato formado como produto secundário de várias reacções metabólicas (Lundin *et al.*, 1991) (Figura 3.8). Relativamente ao metabolismo do piruvato, a presença dos compostos induziu, à semelhança do verificado para as enzimas envolvidas na glicólise/gluconeogénese, subexpressão da enzima Adh1p (Figuras 3.7 e 3.8). Contrariamente, a enzima envolvida no passo anterior, Pdc1p, apresenta-se sobreexpressa nas células cultivadas na presença dos compostos III e IV (Figura 3.8). Trata-se da enzima chave da fermentação alcoólica, comprometendo o piruvato à fermentação alcoólica, em detrimento da gluconeogénese e da respiração aeróbia (ciclo de Krebs) (Pronk *et al.*, 1996). A sobreexpressão da enzima Pdc1p poderá ocorrer como forma de garantir que todo o piruvato formado tenha como destino a produção de etanol. Uma vez que, de acordo com Coyle e colaboradores (2003), a 1,10-fenantrolina e respectivos complexos de Cu, Ag e Mn causam danos a nível mitocondrial, incluindo o desacoplamento entre a cadeia de transporte de electrões e a produção de ATP, o aumento dos níveis de Pdc1p no caso dos compostos III e IV poderá sugerir que estes também estejam envolvidos na inviabilização do processo de fosforilação oxidativa e que, por esse motivo, a célula esteja comprometida à fermentação alcoólica. No entanto, dada a subexpressão da enzima Adh1p, o acetaldeído formado poderá ser convertido em acetato e este ser direccionado para o ciclo de Krebs, em lugar de ocorrer produção de etanol. Neste caso, o direccionamento dos produtos da via metabólica central para a respiração aeróbia não entra em concordância com o desacoplamento entre o transporte electrónico e a produção de ATP verificados por Coyle e colaboradores (2003).

A enzima Ilv5p, envolvida na biossíntese de aminoácidos de cadeia lateral ramificada (Valina, Leucina e Isoleucina) encontra-se subexpressa na presença dos três compostos em estudo, sendo a variação considerada significativa apenas no caso do composto IV. Esta enzima está também envolvida na manutenção do DNA mitocondrial (mtDNA) (Macierzanka *et al.*, 2008; Troitskaya *et al.*, 1995), sendo que as mutações no gene que codifica para esta proteína resultam em células cujas mitocôndrias apresentam perda de material genético (mutantes ρ^-) (Troitskaya *et al.*, 1995). Assim, a sua subexpressão, além de ter um impacto negativo na biossíntese dos referidos aminoácidos, poderá gerar também uma instabilidade do mtDNA e consequentemente contribuir para uma inactivação mitocondrial, sugerindo uma vez mais uma acção dos compostos sobre a função mitocondrial, tal como reportado por Coyle e colaboradores (2003) relativamente a compostos similares.

A proteína Hsp60p, além de desempenhar função de chaperona mitocondrial, estando envolvida no *folding* de proteínas importadas para a mitocôndria, parece intervir também nos processos de replicação e divisão do mtDNA, interagindo com DNA em cadeia simples (Kaufman *et al.*, 2003). A proteína poderá ainda desempenhar um papel na protecção contra a inactivação oxidativa de proteínas, como verificado por Cabiscol e colaboradores (2002) relativamente a duas enzimas com centros Fe/S. Desta forma, a sua sobreexpressão poderá estar relacionada (i) com uma tentativa de aumentar a divisão mitocondrial como forma de contornar possíveis danos que afectem as suas funções, como os reportados por Coyle e colaboradores (2003), mencionado anteriormente, e/ou (ii) com a ocorrência de oxidação de proteínas, de forma a tentar evitar subsequentes reacções de oxidação. Por exemplo, no caso de proteínas contendo centros Fe/S, os átomos de ferro podem ser libertados como resultado da sua oxidação, produzindo *stress* adicional (Cabiscol *et al.*, 2002).

Ainda em termos mitocondriais, verificou-se sobreexpressão da proteína Ssc1p após incubação das células com os compostos de zinco (II e IV) (Figuras 3.7 e 3.8). Esta proteína, uma chaperona da família Hsp70, integra um complexo interveniente na translocação de proteínas para a mitocôndria e encontra-se também envolvida no *refolding* das proteínas importadas (Mokranjac e Neupert, 2009; Horst *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1990). Foram também detectadas variações de expressão significativas relativamente às chaperonas Ssa1p, Ssa2p, Ssb1p e Ssb2p, pertencentes às subfamílias A e B de proteínas Hsp70 citosólicas (Werner-Washburne *et al.*, 1987). As proteínas Ssa1p e Ssa2p encontram-se sobreexpressas na presença dos três compostos. Partilham 99% estrutura primária (Boorstein *et al.*, 1994) e a suas funções incluem o *refolding* de proteínas (Bukau e Horwich, 1998), reactivação de proteínas que sofreram agregação (Glover e Lindquist, 1998) e a integração do complexo Rad9, envolvido no controlo do ciclo celular, estando a sua actividade também associada, desta forma, a danos no DNA (Bosch e Lowndes, 2004; Gilbert *et al.*, 2003). Assim, a sobreexpressão destas isozimas sugere que os compostos poderão induzir alterações no *folding* de proteínas, por exemplo como resultado de danos oxidativos, ou de danos no DNA.

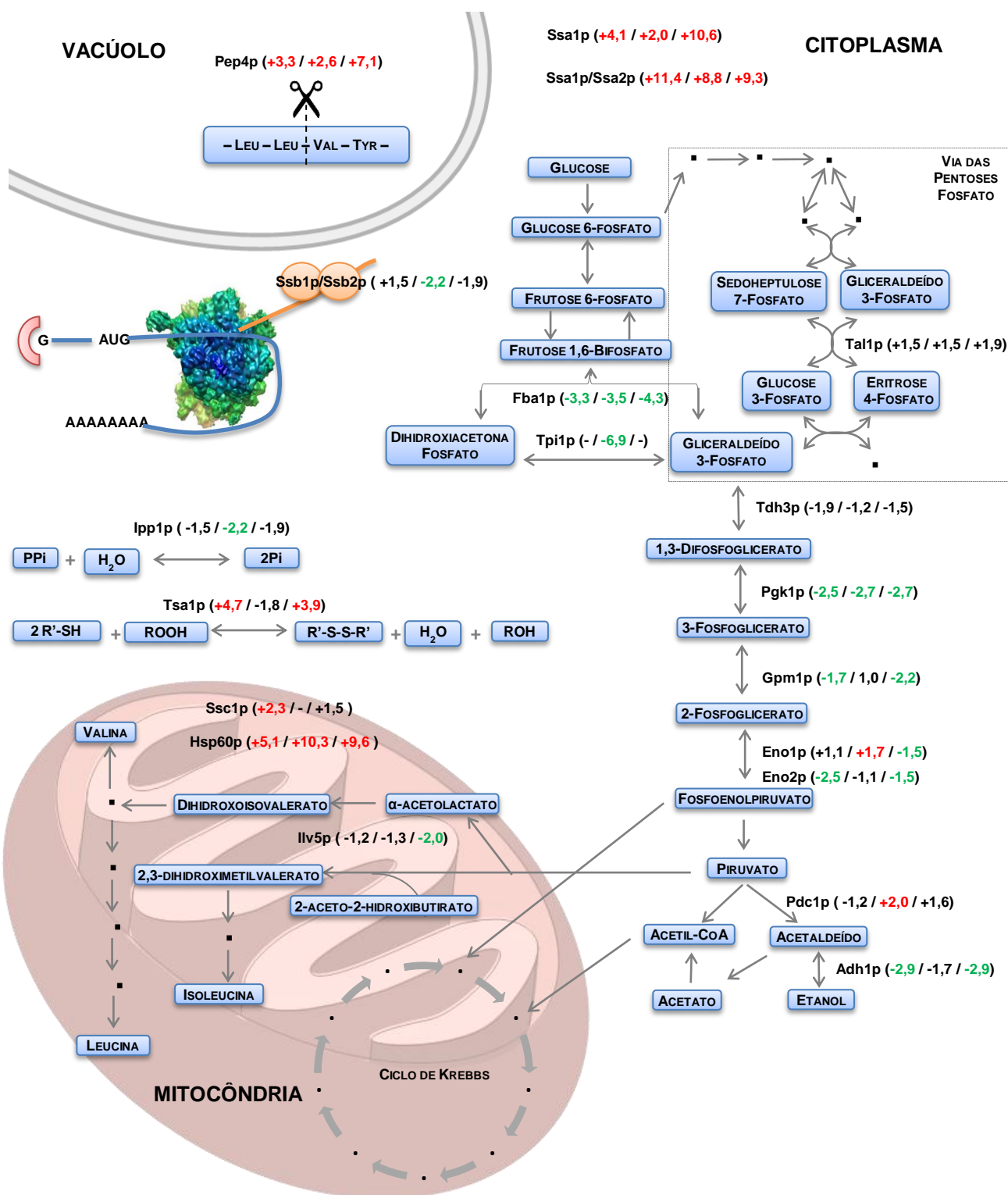


Figura 3.8 – Vias metabólicas e proteínas alteradas em *S. cerevisiae*, em fase de latência induzida pela presença dos compostos organometálicos II, III e IV. Os valores na figura foram calculados com base na razão entre a expressão de proteínas na presença dos compostos II, III e IV relativamente às respectivas expressões em células exponenciais sem a adição de composto. Apenas se encontram representadas, de entre as proteínas identificadas, aquelas cuja variação relativamente ao controlo é superior a 2 vezes em pelo menos um dos compostos, à excepção

das proteínas Tal1p e Tdh3p, que apresentam variações superiores a 1,5x mas o mesmo padrão de variação para três os compostos. Legenda: Proteína (variação composto II / variação composto III / variação composto IV). Proteínas reprimidas na presença dos compostos encontram-se representadas a verde e as proteínas activadas na presença dos compostos encontram-se a vermelho.

As proteínas Ssb1p e Ssb2p encontram-se associadas aos ribossomas, ligando-se aos polipéptidos recém sintetizados, de forma a assegurar a aquisição do folding correcto (Bukau e Horwich, 1998). Estas proteínas apresentam-se subexpressas na presença dos compostos III e IV, possivelmente devido à diminuição da síntese de proteínas durante a fase de latência. Curiosamente, na presença do composto II verifica-se uma sobreexpressão, mas esta encontra-se abaixo do limite de variação considerado (2 vezes).

A proteína Tsa1p actua como chaperona, impedindo a agregação de proteínas ribossomais, e como peroxidase com especificidade para grupos tiol, funcionando como agente antioxidante (Trotter *et al.*, 2008). Encontra-se sobreexpressa na presença dos compostos II e IV e subexpressa na presença do composto III. O facto de ter sido descrito o aumento dos níveis de transcrição do gene *TSA1* na presença de zinco (Yuan, 2000) está de acordo com o resultado de sobreexpressão da proteína correspondente na presença de compostos de zinco (II e IV), sugerindo que poderá estar a ocorrer dissociação destes dois complexos, originando o aumento dos níveis intracelulares deste ião metálico. Dadas as suas funções antioxidantes, os resultados podem igualmente sugerir que os compostos II e IV possam estar envolvidos na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Estes resultados poderão também ser corroborados pelo aumento das chaperonas da família das Hsp70 citosólicas (Ssa1p e Ssa2p) e mitocondriais (Ssc1p) e da chaperona Hsp60p (Figuras 3.7 e 3.8). A sobreexpressão da enzima Tal1p, envolvida na via das pentoses fosfato, também poderá fornecer indicações neste sentido, uma vez que segundo Lee e colaboradores (1999), a expressão desta proteína é induzida pela presença de peróxido de hidrogénio, um potente agente indutor de *stress* oxidativo.

A proteína Pep4p, é uma protease vacuolar envolvida na activação de outras proteases vacuolares (Parr *et al.*, 2007) e desempenha um papel importante no *turnover* de proteínas após danos oxidativos (Marques *et al.*, 2006). Na presença de peróxido de hidrogénio, a proteína migra para o citoplasma e medeia a degradação mitocondrial e de nucleoporinas (Mason *et al.*, 2005). Desta forma, a sua sobreexpressão poderá indicar um aumento da degradação de proteínas oxidadas e/ou ocorrência de degradação mitocondrial, o que entraria em concordância com os dados obtidos por Coyle e colaboradores (2003) relativamente à afectação das funções mitocondriais por acção de complexos de Cu, Ag e Mn contendo 1,10-fenantrolina e do ligando *per se*.

Durante a fase de latência na presença dos complexos organometálicos observou-se de uma forma geral uma subexpressão de enzimas envolvidas na via metabólica central, sugerindo inactivação metabólica das células e corroborando o potencial citostático dos compostos sobre *S. cerevisiae*. Por outro lado, verificou-se a sobreexpressão de enzimas envolvidas em *stress* oxidativo, no *refolding* e na degradação de proteínas. Assim, os compostos poderão estar envolvidos na oxidação de proteínas e consequentemente em alterações conformacionais associadas, desencadeando mecanismos de

refolding. Além disso, os dados parecem sugerir um potencial de acção a nível mitocondrial, não só através da sobreexpressão de uma enzima envolvida na manutenção de DNA mitocondrial como através do aparente favorecimento da fermentação em detrimento da respiração comparativamente às células controlo.

Os ensaios de proteómica com células em fase de latência foram limitados, no entanto, pelas quantidades de compostos disponíveis, o que limitou a quantidade de proteína total extraída nos crescimentos e utilizada nestes ensaios (125 µg em lugar dos normais 300 µg). Por se encontrarem em latência, as culturas expostas aos compostos apresentam densidades menores celulares que as culturas controlo e portanto é necessário efectuar os crescimentos utilizando volumes de cultura superiores. No entanto, esta situação implica a utilização de quantidades maiores destes compostos, que são sintetizados no IST em pequena escala (geralmente em cada *batch* produz-se cerca de 20 mg de composto) e cuja produção em escala aumentada tem muitas das vezes implicações ao nível de pureza dos produtos de síntese. Por este motivo, está em curso a análise proteómica em linhas celulares humanas neoplásicas, na medida em que estas apresentam maior sensibilidade aos compostos e consequentemente poderão ser utilizadas concentrações mais baixas dos compostos estudados, permitindo aumentar o volume das culturas e assim fazer uma análise proteómica com maiores quantidades de proteína total.

No âmbito deste trabalho foram igualmente caracterizadas as proteínas expressas em células de *S. cerevisiae* adaptadas aos três compostos. Na Figura 3.9 podemos observar as proteínas identificadas por espectrometria de massa após 2-D nessas condições.

As células crescidas na presença dos compostos e recolhidas na fase de crescimento exponencial deram origem a extractos proteicos com menor quantidade de proteína total que a cultura controlo (compostoto II 200 µg, composto II 150 µg, composto IV 250 µg). A limitação associada à síntese de pequenas quantidades de compostos por *batch*, mencionada atrás, impediu a realização de crescimentos em volumes superiores, podendo ser utilizadas futuramente linhas celulares humanas, mais sensíveis aos complexos organometálicos.

É importante notar que o número de enzimas envolvidas na via metabólica central com variação de expressão significativa entre as culturas incubadas na presença dos complexos organometálicos e a cultura controlo é substancialmente inferior ao verificado para as células em latência. A variação significativa é observada apenas para o composto III e trata-se, para ambas as enzimas em causa, Tdh3p e Eno1p, de sobreexpressão. A proteína Adk1p, também sobreexpressa, participa na biosíntese de nucleótidos e no metabolismo energético (Gauthier *et al.*, 2008), existindo também indicação de que terá um papel importante na formação do complexo pré-replicativo (pre-RC) em *S. cerevisiae*, necessário ao processo de replicação do DNA (Cheng *et al.*, 2010). Estes resultados são consistentes com o facto das células se apresentarem em fase exponencial, como resultado da adaptação à presença dos compostos, e logo em divisão, encontrando-se metabolicamente activas.

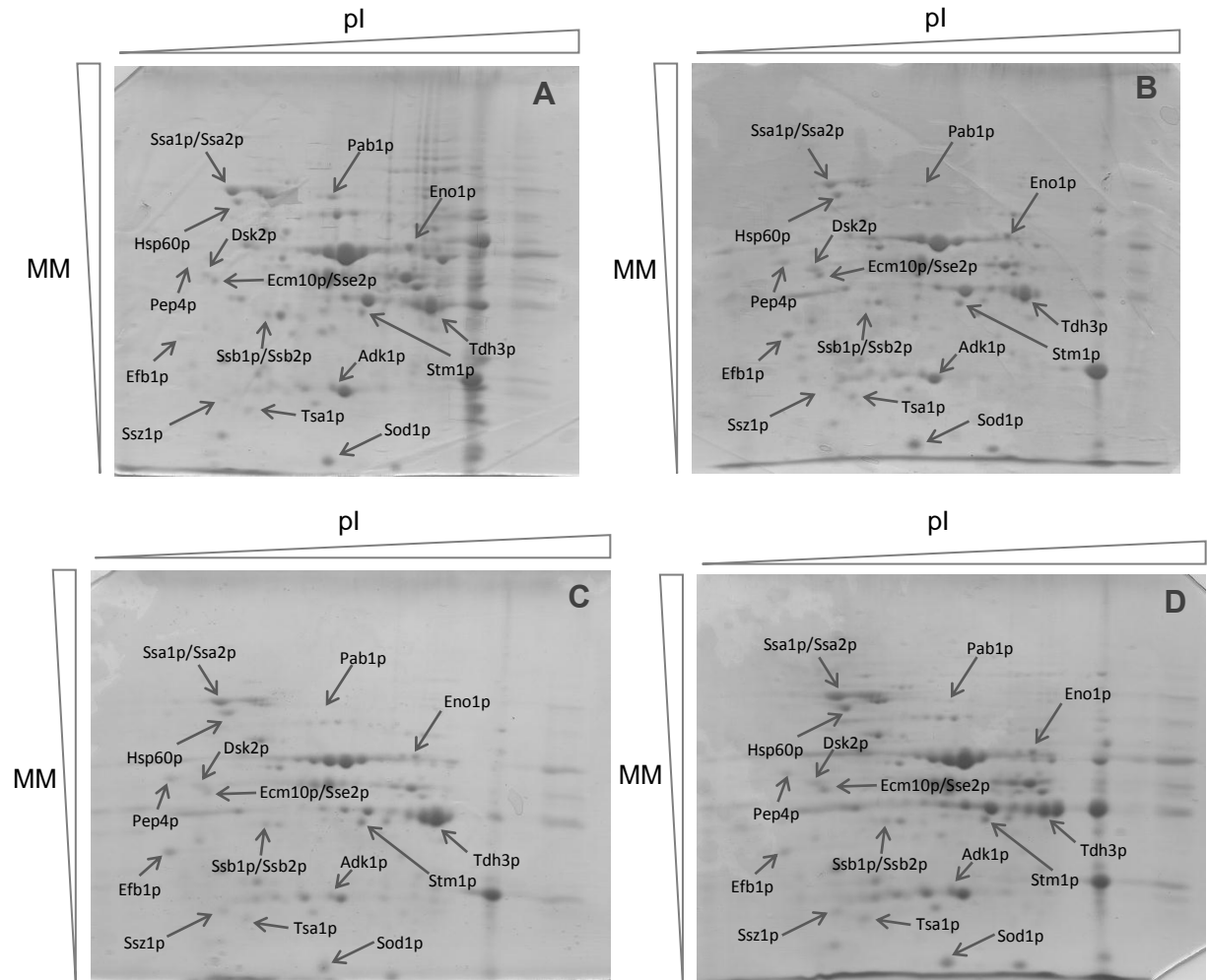


Figura 3.9 – Electroforese bidimensional (2-D) de extractos totais de células de *S. cerevisiae* recolhidas durante fase exponencial ($OD_{600} = 1,0 \pm 0,05$) de crescimentos em meio MMB pH 4,0 (A) na ausência de qualquer composto e em meio suplementado com (B) 20 μ M de composto II, (C) 20 μ M de composto III e D) 30 μ M de composto IV. As proteínas identificadas com variação de expressão considerada significativa (superior a 2x) entre pelo menos uma das amostras e o controlo encontram-se assinaladas na figura, associadas ao respectivo *spot*. Estes géis são representativos de todos os géis realizados para as mesmas condições.

A proteína Hsf1p encontra-se presente nas células numa forma inactiva, sendo activada como resposta a *stress* (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010), o que significa que deverá estar envolvida num mecanismo de resposta rápida. Este facto entra em concordância com valores de variação mais positivos, portanto maior sobreexpressão, para as proteínas codificadas por genes cuja expressão é activada por este factor de transcrição (Ssa1p, Ssa2p e Hsp60p) nas células recolhidas em fase de latência, que se encontram ainda numa fase inicial de contacto com os agentes indutores de *stress*. O gene que codifica para a chaperona Sse2p também é activado pelo factor de transcrição Hsf1p (Liu *et al.*, 1999). As cheperonas citoplasmáticas Ssb1p, Ssb2p e Sse2p também se encontram sobreexpressas, em particular esta última, sendo a expressão dos respectivos genes activada pelos factores de transcrição

Yap1p e Pdr3p, de acordo com a base de dados *Yeasttract* (www.yeasttract.com). Yap1p constitui o principal activador transcricional de genes envolvidos na resposta a *stress* oxidativo (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2010). Pdr3p, por sua vez, activa a transcrição de genes envolvidos numa resposta adaptativa a múltiplos compostos (PDR, de *pleiotropic drug resistance*) em levedura, equivalente à resistência a múltiplos compostos (MDR, de *multiple drug resistance*) em células tumorais, nomeadamente os genes *PDR5*, *PDR10*, *PDR15*, *SNQ2*, *YOR1*, todos codificantes para proteínas transmembranares da família ABC, envolvidos na translocação de xenobióticos para o exterior das células (Jungwirth e Kuchler, 2006). A sobreexpressão das referidas chaperonas envolvidas no *folding* de polipéptidos sintetizados encontra-se em concordância com a sobreexpressão de outras proteínas com funções associadas à síntese proteica, designadamente Efb1p e Ssz1p. A primeira é um factor de alongamento da tradução, responsável pela troca de GDP, associado ao factor de alongamento 1 α , por GTP, reactivando-o para que possa ligar-se a tRNAs e promover a sua ligação ao ribossoma, no sítio A (Carr-Schmid *et al.*, 1999). Ssz1p é, à semelhança de Ssb1p, Ssb2p e Sse2p, uma chaperona que se associa aos ribossomas e participa na aquisição do *folding* correcto por parte dos polipéptidos sintetizados, tendo-lhe sido também associado, no entanto, um papel ainda não totalmente esclarecido na resistência pleiotrópica a compostos (PDR) quando sobreexpressa (Eisenman e Craig, 2004; Hallstrom *et al.*, 1998). Assim, poderá estar a ocorrer um aumento da síntese proteica de forma a garantir o crescimento na presença destes compostos e que pode igualmente passar pelo aumento da produção de proteínas envolvidas na resistência aos compostos, se tivermos em conta a referida função da proteína Ssz1p neste aspecto. A PDR ocorre por activação da expressão de transportadores ABC envolvidos no efluxo dos compostos para o exterior da célula (Eisenman e Craig, 2004). As proteínas ABC, sendo transmembranares, não são detectadas pelo método utilizado, que permite avaliar apenas a expressão da fracção proteica solúvel.

As enzimas antioxidantes Tsa1p e Sod1p também se encontram sobreexpressas, indicando que apesar de encontrarem em crescimento exponencial, as células continuam com mecanismos de resposta a *stress* oxidativo activos.

A proteína Stm1p foi descrita como estando envolvida num grande número de processos celulares, incluindo apoptose, regulação do ciclo celular, degradação de mRNA e resposta a *stress* nutricional, podendo a sua associação a esta variedade de processos ser explicada, segundo Van Dyke e colaboradores (2009), pela sua interacção com ribossomas 80S e consequente participação na síntese proteica, intervindo portanto na síntese de proteínas envolvidas nos processos celulares mencionados. Stm1p também interage com o DNA, especificamente com quadruplexes G4³, estruturas encontradas nas regiões teloméricas, cuja manutenção também consiste numa das funções da referida proteína, por interacção, em *S. cerevisiae*, com Cdc13p⁴ (Hayashi e Murakami, 2002).

³ Também designados por tetraplexes, consistem em arranjos espaciais entre quatro cadeias de DNA, ricas em guaninas (ou citosinas no caso dos quadruplexes C4) encontradas nas extremidades teloméricas dos cromossomas e estabilizadas por emparelhamentos de Hoogsteen (Blackburn *et al.*, 2006)

⁴ Proteína de ligação a DNA em cadeia simples nas regiões teloméricas, com funções de protecção de telómeros e regulação da actividade da enzima telomerase (Lustig, 2001)

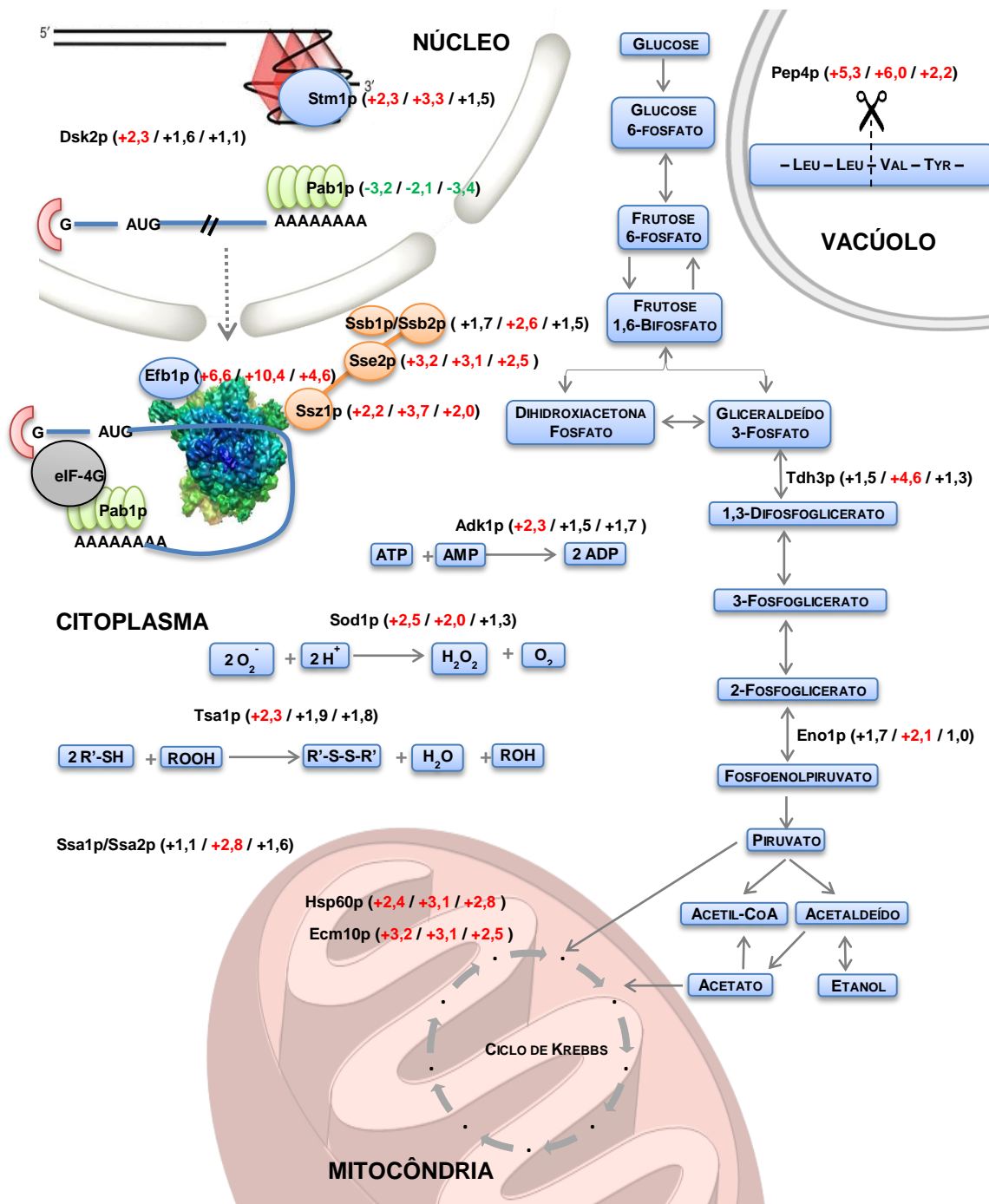


Figura 3.10 – Vias metabólicas e proteínas alteradas em *S. cerevisiae*, em fase exponencial de crescimento por adaptação à presença dos compostos organometálicos II, III e IV. Os valores na figura foram calculados com base na razão entre a expressão de proteínas na presença dos compostos II, III e IV relativamente às respectivas expressões em células exponenciais sem a adição de composto. Apenas se encontram representadas, de entre as proteínas identificadas, aquelas cuja variação relativamente ao controlo é superior a 2 vezes em pelo menos um dos compostos. Legenda: Proteína (variação composto II / variação composto III / variação composto IV). Proteínas reprimidas na presença dos compostos encontram-se representadas a verde e as proteínas activadas na presença dos compostos encontram-se a vermelho.

Dado que a proteína Stm1p tem um impacto em várias funções celulares, torna-se menos óbvio o motivo da sua variação de expressão. No entanto, dado o aumento dos níveis de várias proteínas de resposta a *stress*, a sobreexpressão de Stm1p, como acontece por exposição das células aos compostos II e III, poderá estar relacionada com a sua participação na síntese das referidas proteínas.

A proteína Pep4p encontra-se sobreexpressa na presença dos três compostos, à semelhança do que se observou nas células em fase de latência, indicando que as células em crescimento exponencial ainda mantêm activa a degradação de proteínas potencialmente oxidadas ou de mitocôndrias contendo danos (Marques *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2005) iniciada na fase de latência, e discutida anteriormente.

De acordo com Biggins e colaboradores (1996), a proteína Dsk2p está envolvida na duplicação do centro organizador de microtúbulos, em levedura designado por SPB (de *spindle pole body*), necessária à formação do fuso mitótico. Além disso, apresenta um domínio de interacção com o proteossoma e com um domínio de ligação a cadeias de poli-ubiquitina, devendo portanto participar na degradação de proteínas (Funakoshi *et al.*, 2002), indo novamente na direcção da eliminação de proteínas eventualmente oxidadas ou desnaturadas. Dada a sobreexpressão verificada para as chaperonas Ssa1p e Ssa2p e para a proteína Pep4p, que intervêm respectivamente no *refolding* e degradação de proteínas, como discutido anteriormente, o aumento dos níveis de Dsk2p na presença dos compostos, face ao controlo, poderá dever-se à sua participação na degradação de proteínas afectadas pelo *stress* imposto pela presença dos compostos, intervindo na homeostase proteica, para que não haja acumulação destas e desenvolvimento, por exemplo, de *stress* proteotóxico.

Ecm10p, uma proteína pertencente à família Hsp70, partilha 82% da sequência de aminoácidos com Ssc1p e atenua as falhas na importação de proteínas para a mitocôndria em mutantes *ssc1*, pelo que a sua função deverá estar relacionada com a translocação de proteínas endereçadas para este organelo (Braumann *et al.*, 2000). Assim, à semelhança do verificado para as células em fase de latência, aparentemente verifica-se um aumento do tráfego de proteínas para a mitocôndria na fase exponencial, apesar da variação de expressão ter sido detectada em proteínas diferentes.

3.3. AVALIAÇÃO DA INTERACÇÃO COM O DNA

3.3.1. ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS: AFINIDADE E MODO DE LIGAÇÃO AO DNA

A espectroscopia de absorção electrónica, na região espectral do ultravioleta próximo e do visível, é amplamente utilizada para estudar a interacção de moléculas com o DNA (Wang *et al.*, 2009). A espécie titulante, neste caso o DNA, é adicionada quer à amostra quer à referência, e a absorvância medida é corrigida em termos da diluição da amostra pela adição de solução de DNA. Desta forma, qualquer variação espectral observada deverá provir da interacção entre os compostos e o DNA. Por outras palavras, após a adição de DNA a uma solução de determinado composto, a inexistência de qualquer variação da absorvância indica que o composto em causa não terá capacidade de interagir com o DNA, nas condições estudadas (Kelly *et al.*, 1985). A doxorubicina, titulada como composto de referência, é um intercalante não específico de DNA (Neidle, 1979). A intercalação traduz-se espectroscopicamente

numa diminuição da intensidade de uma banda espectral (efeito hipocrômico) e no desvio de uma banda espectral para comprimentos de onda maiores (desvio batocrômico ou, menos formalmente, *red shift*) (Plumbridge e Brown, 1977). A titulação UV-visível dos compostos II, III e IV com DNA de timo de bezerro (CT-DNA, de *Calf Thymus* DNA) resulta, em todos os casos, num efeito hipocrômico, à semelhança da doxorubicina (Figura 3.11).

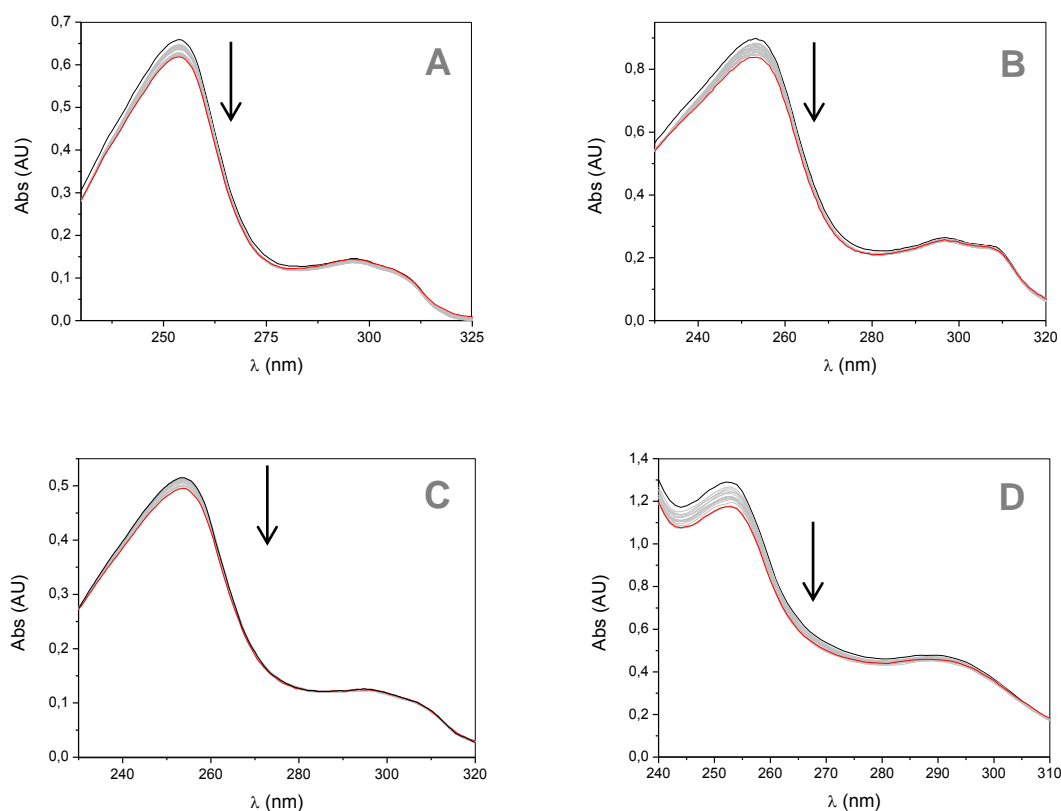


Figura 3.11 – Espectros de ultravioleta dos compostos II (12 μM) (A), III (7 μM) (B) e IV (20 μM) (C) e da doxorubicina (60 μM) (D) na ausência (linha a preto) e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA, estando o espectro traçado na presença da maior concentração de DNA representado a vermelho. As setas indicam a variação da absorvância com o aumento da concentração de DNA (0 - 20 μM). Os espectros foram traçados em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02.

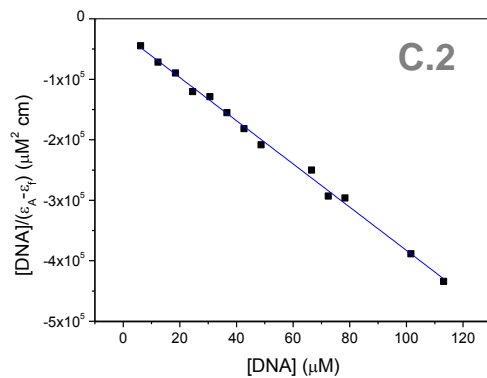
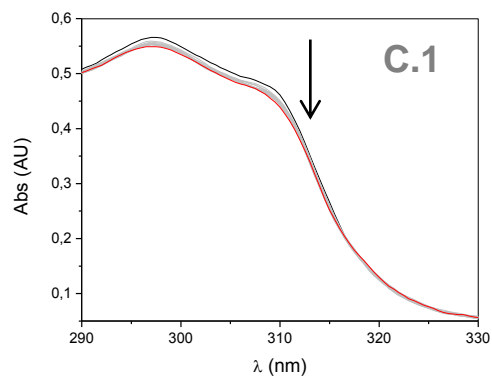
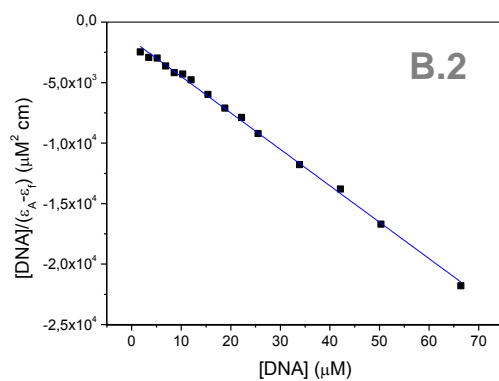
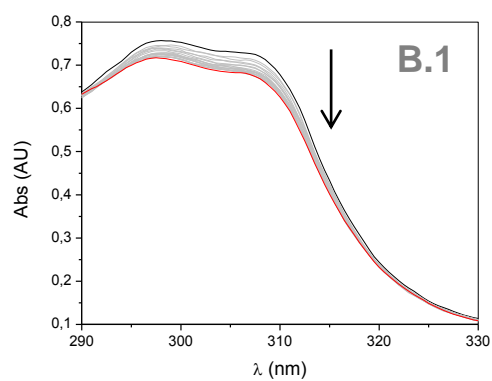
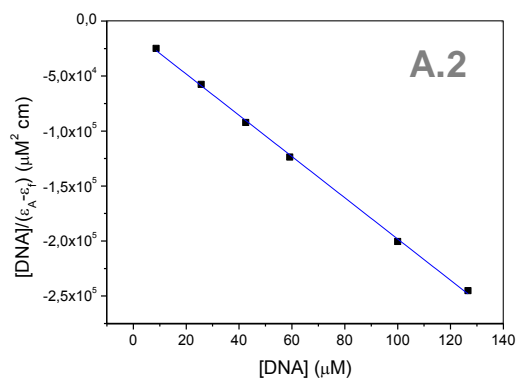
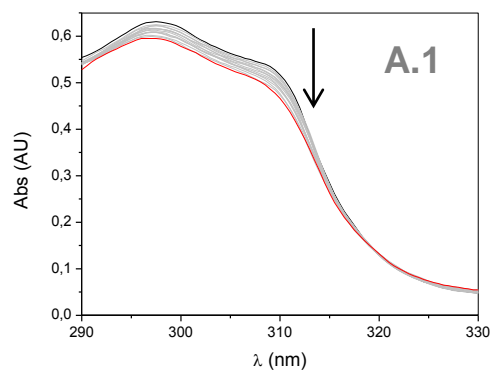
A capacidade de intercalação é tanto maior quanto mais pronunciado for o hipocromismo observado (Wang *et al.*, 2007). Este efeito é mais marcado no caso da doxorubicina e portanto, existindo intercalação dos complexos metálicos no DNA, estes não deverão apresentar uma capacidade intercalante tão forte quanto a doxorubicina. A interacção do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (phen=1,10-fenantrolina) com o DNA foi já estudada por espectrofotometria por Ni e colaboradores (2006), tendo sido verificada também a ocorrência de hipocromismo. Os autores referem também a ocorrência de um ligeiro desvio hipsocrômico (desvio da banda espectral analisada para comprimentos de onda menores),

relacionando as alterações espectroscópicas verificadas com a possível interacção por intercalação e com a atracção electrostática entre o complexo metálico, dada a sua carga positiva, e o DNA. Apesar dos complexos testados se encontrarem, também, carregados positivamente, não foi observado qualquer desvio hipsocrómico (Figura 3.11). Também não se observaram desvios batocrómicos, mantendo-se os máximos de absorvância nos mesmos comprimentos de onda registados nos espectros dos complexos livres (sem DNA). De acordo com Ramakrishnan e colaboradores (2011), a existência de hipocromismo sem que haja qualquer manifestação batocrómica deverá significar que os compostos interagem com o DNA por interacção com sulcos em lugar de o fazerem por intercalação. Tendo isto em conta, e sendo a doxorubicina um intercalante, como já mencionado, sopunha-se que ocorresse um desvio batocrómico, que no entanto não foi verificado (Figura 3.11). Além disso, a interacção do complexo $[Zn(phen)(DION)Cl]^+$ com o DNA foi também estudada por espectrofotometria, tendo-lhe também sido atribuída capacidade de intercalação com base no hipocroísmo observado (Yuan *et al.*, 2006).

Por estes motivos, os resultados de espectrofotometria não permitem uma distinção muito clara entre a intercalação e a interacção com sulcos. No entanto, são um bom indicador de que existe interacção entre os compostos e o DNA e de que esta assenta num destes dois modos de ligação. Poderá futuramente optar-se pela realização de estudos de viscosidade que, dada a sua grande sensibilidade a variações ao nível do comprimento das cadeias de DNA, são muito úteis para comprovar de forma menos ambígua a existência de intercalação (Satyanarayana *et al.*, 1992).

A análise espectrofotométrica, além de fornecer indicações sobre os possíveis modos de interacção, pode também ser aplicada à determinação da afinidade que os compostos têm para interagir com o DNA, sendo para isso determinada a constante de afinidade para cada composto. Para isso, é necessário determinar primeiro os coeficientes de extinção molar de forma a poder aplicar-se a equação 5 (secção 2.4). Os valores correspondentes encontram-se na tabela 3.3.

A determinação das constantes de afinidade foi efectuada com base nos máximos de absorvância a 298 nm, para os compostos II, III e IV, apesar das bandas a 254 nm apresentarem maior intensidade. Procedeu-se deste modo devido à capacidade que o composto III evidenciou de introduzir quebras no DNA, dado que estas poderão induzir um aumento da absorvância a 260 nm (hipercromismo), interferindo com a quantificação da capacidade de interacção por mecanismos que resultem em hipocromismo nesta região espectral, como é o caso, já mencionado, da intercalação ou da interacção com sulcos. A doxorubicina apresenta um máximo de absorvância a 253 nm mas, uma vez estabelecido o critério mencionado para os complexos organometálicos, utilizou-se a banda a 289 nm, por motivos de conformidade. A doxorubicina apresenta ainda uma banda na região do visível, a cerca de 490 nm. No entanto, as bandas na região do visível dos complexos organometálicos são muito pouco intensas, pelo que se optou pela realização das titulações na região do ultravioleta.



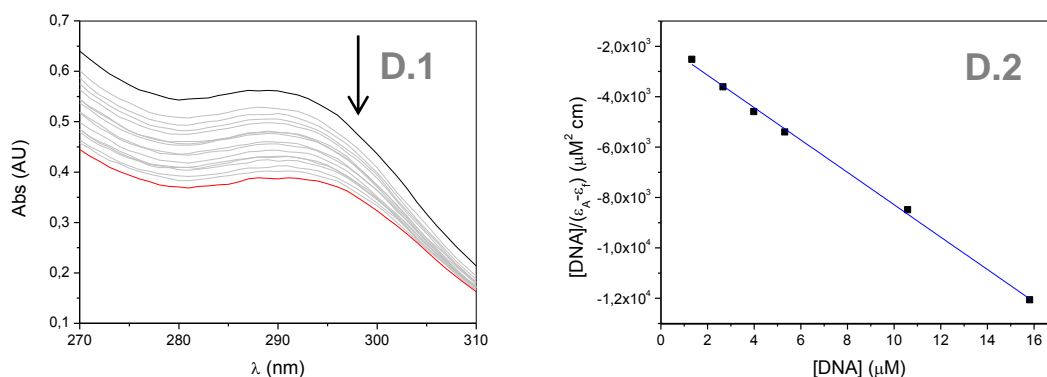


Figura 3.12 – Aplicação da variação do comportamento espectral dos compostos por adição de alíquotas de CT-DNA ao cálculo das constantes de ligação. Do lado direito encontram-se as regressões lineares correspondentes aos espectros do lado esquerdo resultantes da aplicação da equação 7 (secção 2.4). (A) 35 μM de composto II, (B) 25 μM de composto III, (C) 55 μM de composto IV e (D) 60 μM de doxorrubicina em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02. Os espectros a preto foram traçados na ausência de DNA, a vermelho encontram-se representados os espectros traçados na presença da maior concentração de DNA, utilizada em cada caso, e a cinza estão representados os espectros traçados na presença de concentrações intermédias de DNA (0 - 200 μM). As setas indicam a variação da absorvância como resultado do aumento da concentração de CT-DNA em solução.

Tabela 3.3 – Valores correspondentes aos coeficientes de extinção molar (ϵ_f) e às constantes de ligação (K_b) a CT-DNA, em Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02, por aplicação, respectivamente, das equações 5 e 7, apresentadas na secção 2.4.

	λ (nm)	ϵ_f ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)	K_b ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$)
Composto II	298	17034	$1,64 (\pm 0,16) \times 10^5$
Composto III		26682	$2,05 (\pm 0,04) \times 10^5$
Composto IV		9913	$1,37 (\pm 0,04) \times 10^5$
Doxorrubicina	289	8631	$3,48 (\pm 0,04) \times 10^5$

As constantes de ligação obtidas apresentam-se todas na mesma ordem de grandeza e os valores são semelhantes ou superiores aos reportados para outros complexos organometálicos de metais de transição, testados em condições semelhantes, como por exemplo (i) complexos de ruténio contendo ligandos assimétricos tridentados derivados da 1,10-fenantrolina, com capacidade de intercalação no DNA: $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})]^{2+}$ ($K_b = 2,49 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})]^{2+}$ ($K_b = 9,51 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]^{2+}$ ($1,62 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (onde *tpy*, *dppt*, *pta* e *ptp* correspondem, respectivamente, a 2,2':6,2"-terpiridina, 3-(1,10-fenantrolina-2-il)-as-triazina, 3-(1,10-fenantrolina-2-il)-as-triazino[5,6-*f*]acenaftileno e 3-(1,10-fenantrolina-2-il)-as-triazino[5,6-*f*]fenantreno) (Chao *et al.*, 2002); (ii) complexos de cobre com capacidade de clivar o DNA contendo 1,10-fenantrolina $[\text{Cu}(\text{saltyr})(\text{phen})]$ ($K_b = 3,47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$); $[\text{Cu}(\text{saltyr})(\text{bipy})]$ ($K_b = 3,01 \times 10^4$

M⁻¹) (correspondendo *saltyr* a salicilideno tirosina, *phen* a 1,10-fenantrolina e *bipy* a 2,2'-bipiridina) (Reddy e Shilpa, 2011); (iii) complexo de zinco com 1,10-fenantrolina-5,6-diona classificado como agente intercalante, [Zn(phen)(dion)Cl]⁺ (K_b = 2,4 x 10⁴ M⁻¹) (Yuan *et al.*, 2006).

De entre os valores obtidos, o da constante de interacção da doxorubicina foi o mais elevado, pelo que deverá possuir maior afinidade para o DNA do que os complexos organometálicos. O facto do valor em causa ser quase duas vezes superior ao obtido para o complexo com maior tendência para interagir com o DNA, o de cobalto, apenas significa que a doxorubicina terá aproximadamente o dobro da afinidade para o DNA. Isto é, não significa que seja mais genotóxica que os compostos em estudo, uma vez que a genotoxicidade poderá depender mais do tipo de lesões causadas do que da afinidade das moléculas para o DNA. Por exemplo, o facto de o composto III introduzir quebras em cadeia dupla, como será discutido adiante, sugere que seja mais genotóxico que a doxorubicina, uma vez que as quebras em cadeia dupla são geralmente consideradas as lesões mais tóxicas (Helleday *et al.*, 2008). No entanto, a constante de ligação constitui uma forma de avaliar se o DNA poderá ser um potencial alvo dos compostos. No presente caso verifica-se que de facto a interacção com o DNA poderá estar na origem da acção antitumoral dos compostos, ainda que o DNA não seja necessariamente o único alvo celular dos mesmos.

3.3.2. ENSAIOS COM DNA PLASMÍDICO

O facto de o DION ter sido já caracterizado como indutor de quebras não específicas no DNA (McCann *et al.*, 2004) despertou o interesse sobre o estudo da manutenção da capacidade de clivagem do DNA por parte dos complexos com este ligando. A incubação de 200 ng do plasmídeo pBluescript SK II (pBSK II) com os compostos II e IV revelou que, até à concentração máxima testada inicialmente (100 µM) não ocorreu variação significativa da distribuição das 3 isoformas do plasmídeo, de acordo a avaliação efectuada por densitometria (Figura 3.13). Por outro lado, a presença do composto III induziu um aumento da percentagem da forma linear (FIII), superior ao triplo do valor controlo para 100 µM de composto, e diminuição da percentagem da forma superenrolada (FI), sem ocorrer variação significativa da forma circular relaxada (FII), mesmo para a concentração mais baixa testada (25 µM) (Figura 3.13). Tal situação pode apenas ser explicada por uma capacidade de introdução de quebras em cadeia dupla. Caso a capacidade de clivagem envolvesse corte em cadeia simples, ocorreria primeiro aumento de FII, que resulta de um único corte sobre FI, e só depois esta seria convertida em FIII, após introdução de um segundo corte na proximidade do primeiro (a cerca de não mais de 12 pares de bases de distância (Mancin e Tecilla, 2009) (dar-se-ia, portanto, uma transição FI → FII → FIII). Como os resultados não mostram aumento de FII e como não houve desaparecimento completo de FI, apenas a transformação directa FI → FIII explica os valores obtidos.

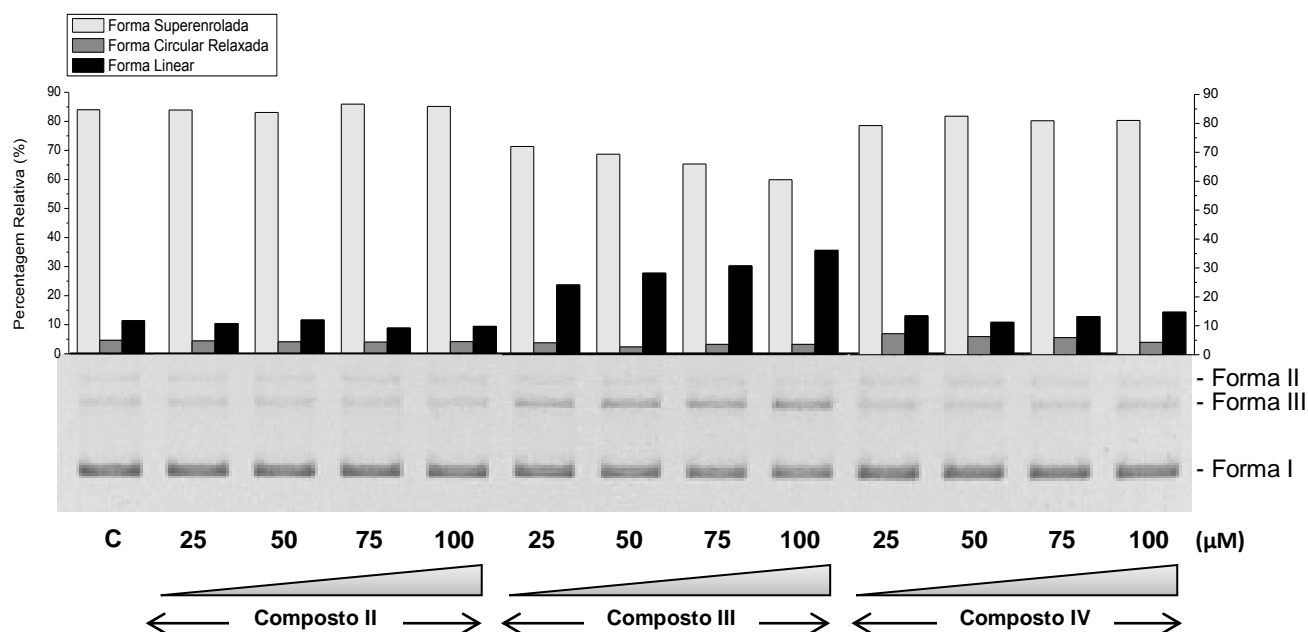


Figura 3.13 – Efeito da incubação de DNA plasmídico com várias concentrações dos compostos II, III e IV. As amostras, com volume total de 20 μL, foram incubadas durante 24 h a 37°C em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02. Controlo (C): DNA plasmídico pBSK II (200 ng). Amostras: pBSK II (200 ng) incubado com respectiva concentração de composto (μM) indicada na base do gel. DNA plasmídico superenrolado (Forma I), circular relaxado (Forma II) e linear (Forma III). Gel corado com brometo de etídeo após electroforese. Gráfico de barras indica distribuição das conformações do pDNA, em percentagem, como resultado da análise densitométrica do gel através do programa ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/). A imagem do gel encontra-se representada com inversão de cores para maior clareza e é representativa de várias experiências independentes.

Existem poucas descrições de complexos metálicos mononucleares com capacidade de actuar como nucleases artificiais (Mancin e Tecilla, 2009). Um destes complexos com capacidade de actuar como metalonuclease, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, cliva preferencialmente a forma B do DNA, em detrimento de DNA em cadeia simples e das restantes conformações em cadeia dupla (A e Z). A clivagem é dependente da ligação reversível do complexo ao DNA, que será potenciada por interacções electrostáticas, uma vez que a modificação do complexo de forma a conferir-lhe carga global negativa impede a sua interacção com o DNA (Thederahn *et al.*, 1989). O mecanismo de clivagem deste complexo consiste num processo ordenado, iniciado pela redução do átomo de cobre, seguindo-se a ligação reversível ao DNA e a formação de uma espécie cobre-‘oxo’ por reacção com peróxido de hidrogénio, que é responsável pelos danos no DNA e cuja estrutura não é ainda conhecida (Bales *et al.*, 2005). A reacção é totalmente dependente da presença de peróxido de hidrogénio, sendo completamente bloqueada pela presença de catalase (Sigman *et al.*, 1993). Possivelmente, a falta de actividade do composto II comparativamente a este poderá dever-se ao facto do zinco, ao contrário do cobre e de outros metais de transição do primeiro período, como o cobalto, não ter actividade redox, como consequência de possuir uma orbital d

completamente preenchida (McCall *et al.*, 2000). Estudos de clivagem efectuados com o complexo $[\text{Zn}(\text{phen})(\text{DION})\text{Cl}]^+$ revelaram que apresenta capacidade de introduzir quebras no DNA, numa das cadeias da hélice dupla, tendo sido proposto o mecanismo de clivagem representado na figura 3.14 (Yuan *et al.*, 2006). Os autores propõem o mecanismo assumindo a substituição do átomo de cloro por um ião hidroxilo ou uma molécula de água. De facto, a participação deste tipo de ligandos no mecanismo é consistente com o facto de não ter sido observada clivagem induzida pelo composto II que apenas apresenta DION na coordenação do ião de zinco. Portanto, neste mecanismo o ião metálico estabelece uma interacção electrostática, não sendo necessário possuir actividade redox, mas sendo necessário que possua um ligando que possa participar nos ataques nucleofílicos envolvidos no processo de clivagem.

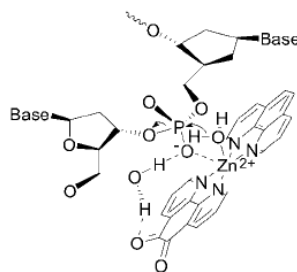


Figura 3.14 – Mecanismo de clivagem de ligações fosfodiéster proposto por Yuan e colaboradores (2006) para o complexo $[\text{Zn}(\text{phen})(\text{DION})\text{Cl}]^+$, em que existe a substituição prévia do átomo de cloro do complexo por uma molécula de água, à semelhança do que se verifica para a cisplatina. Esta substituição é importante na medida em que a molécula de água na coordenação do zinco tem um papel fundamental no mecanismo de clivagem por funcionar como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo.

No que respeita a complexos de cobalto, foi descrito um mecanismo de clivagem hidrolítica de DNA para os complexos $[\text{Co}(\text{cyclen})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$ e $[\text{Co}(\text{tamen})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$, a 37°C e pH 7,6, sendo, no entanto, necessária uma concentração relativamente alta de cada um dos compostos (1 mM). De acordo com os autores, o possível mecanismo de hidrólise envolve a perda de uma molécula de água na coordenação do cobalto e a sua substituição por um átomo de oxigénio de um grupo fosfato do DNA. Seguir-se-á um ataque nucleofílico pelo átomo de oxigénio do ligando hidroxilo ao átomo de fósforo, resultando num intermediário pentacoordenado (relativamente ao átomo de fósforo) (Figura 3.15 A), que poderá dar origem a dois produtos de hidrólise diferentes (Dixon *et al.*, 1996). O mecanismo será portanto equivalente à associação dos representados nas figuras 1.17 A e 1.17 B. O composto III apresenta também, em termos de ligandos monodentados que possam participar no referido mecanismo, uma molécula de água. Contudo em lugar de um grupo hidroxilo, apresenta um átomo de cloro que, tendo em consideração a substituição de ligandos que ocorre na cisplatina (Kelland, 2007), poderá eventualmente ser substituído por uma segunda molécula de água. Assim, após perder primeiro uma molécula de água como resultado do ataque nucleofílico do oxigénio do grupo fosfato ao ião metálico (substituição nucleofílica), de forma equivalente ao primeiro passo do mecanismo proposto por Dixon e colaboradores (1996), a segunda molécula de água poderá ser alvo de um ataque nucleofílico através de catálise ácida,

como representado na figura 1.17 E. Desta forma, o mecanismo resultante poderá ser o ilustrado pela figura 3.15 B, ou seja, será equivalente à associação dos representados pelas figuras 1.17 A e 1.17 E.

A clivagem dependente da formação de ligações covalentes também é suportada pelos resultados obtidos por Ghosh e colaboradores (2006), que indicam que um complexo muito semelhante, $[\text{Co}(\text{DION})_2\text{Cl}_2]^+$, se liga covalentemente ao DNA, tendo Barton e Lolis (1985) reportado anteriormente a ligação covalente do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ ao DNA. No entanto, para poder avaliar se de facto a ligação covalente está associada ao mecanismo de clivagem será necessário efectuar futuramente ensaios específicos para detecção deste tipo de ligações ‘composto-DNA’.

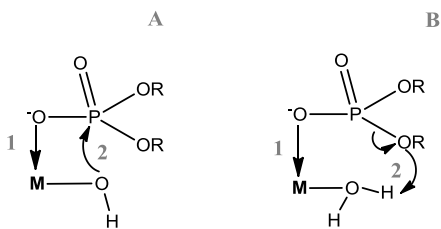


Figura 3.15 – Representação de reacções de clivagem de ligações fosfodiéster catalizadas por complexos metálicos. Centro metálico representado por M. (A) Mecanismo de clivagem pelos complexos $[\text{Co}(\text{cyclen})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$ e $[\text{Co}(\text{tamen})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^{2+}$, representado com base nas descrições de Dixon e colaboradores (1996); (B) mecanismo de clivagem proposto para o composto III por analogia ao descrito por Dixon e colaboradores (1996) e tendo em conta os diferentes mecanismos de catálise da hidrólise de ligações fosfodiéster promovida por átomos metálicos descritos por Mancin e Tecilla (2009) e Williams e colaboradores (1999).

Para uma melhor análise da interacção entre o composto III e o DNA plasmídico procedeu-se a um ensaio de incubação dependente do tempo e na presença de uma concentração superior do composto III. Os resultados obtidos permitem verificar que, de facto, o complexo em causa tem capacidade de interagir com o DNA através de dois mecanismos diferentes, uma vez que são observados dois efeitos distintos (Figura 3.16). Um deles consiste na introdução de quebras no DNA, como tinha já sido observado (Figura 3.13). Contudo, a introdução do tempo como variável permite verificar que a clivagem ocorre tão rapidamente que mesmo parando a reacção por adição de EDTA (Otero *et al.*, 2007) e pela diminuição da temperatura imediatamente após a adição de composto ao DNA, existe um aumento substancial da banda correspondente à forma linear (Figura 3.16 B). Por outro lado, é possível observar também um ligeiro retardamento da mobilidade electroforética do plasmídeo dependente do tempo de incubação (Figura 3.16 C). A forma superenrolada do plasmídeo apresenta um estado topológico que é definido pelo *linking number*, ou seja, pelo número de vezes que uma das cadeias da hélice dupla se encontra enrolada em torno da segunda cadeia, quando o plasmídeo é forçado a permanecer num plano (Blackburn *et al.*, 2006). De acordo com Keck e Lippard (1992), o *linking number* (α) depende do número de voltas helicoidais (β) do DNA em cadeia dupla e do número de voltas super-helicoais (τ), de acordo com a seguinte equação:

$$\alpha = \beta + \tau \quad (8)$$

Uma vez que α se mantém constante, desde que a molécula permaneça em cadeia fechada, a diminuição de β , devida ao desenrolamento do DNA, é acompanhada por um aumento de τ , ou seja, por uma diminuição do superenrolamento, uma vez que τ toma um valor negativo. Assim, um composto que provoque desenrolamento do DNA estará a reduzir também a densidade super-helicoidal e consequentemente a migração do DNA em gel de agarose (Keck e Lippard, 1992).

Os agentes intercalantes, como já referido na secção 1.6, provocam desenrolamento da hélice dupla de DNA (Lenglet e David-Cordonnier, 2010) e portanto poderá utilizar-se esta consequência do seu mecanismo de acção como forma de detecção deste tipo de agentes, através do retardamento da mobilidade electroforética em gel de agarose. De facto, verifica-se uma diminuição ligeira da densidade super-helicoidal da forma superenrolada, que se traduziu num retardamento da sua mobilidade electroforética, com o aumento do tempo de incubação (Figura 3.16). Por este motivo, o composto poderá estar envolvido no desenrolamento do DNA, podendo tratar-se de um agente intercalante. O complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, tetraédrico, está descrito como agente de interacção com o sulco menor do DNA (Robertazzi *et al.*, 2009; Bales *et al.*, 2005; Sigman *et al.*, 1993) (Figura 3.17) enquanto que os complexos octaédricos de 1,10-fenantrolina, $[\text{M}(\text{phen})_3]^{n+}$ (M=ródio, ferro, zinco e colbalto), tendem a interagir com o sulco maior, dado que o seu diâmetro médio, 10 Å, os torna demasiado volumosos para interagir com o sulco menor (Sigman *et al.*, 1993), apesar de existirem evidências de que o complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ constitua uma excepção (Eriksson *et al.*, 1992).

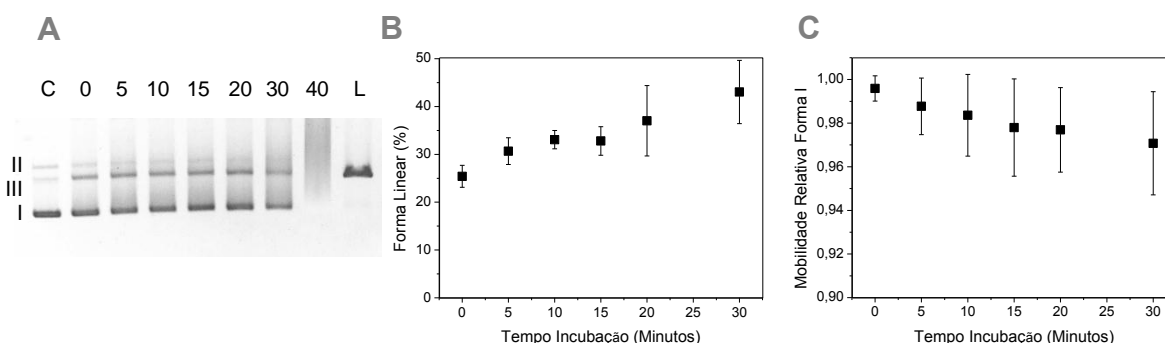


Figura 3.16 – Efeito do tempo de incubação sobre a interacção do composto III com DNA plasmídico. (A) Retardamento da mobilidade electroforética da forma superenrolada (I) e indução da forma linear (III) de forma dependente do tempo de incubação. Gel corado com brometo de etídeo após electroforese. As amostras, com volume total de 20 μL , foram incubadas a 37°C em tampão Tris-HCl 5 mM, NaCl 50 mM, pH 7,02, sendo as reacções paradas por adição de EDTA 25 mM ao final do tempo de incubação correspondente, indicado na parte superior do gel. C: pBSK II (400 ng). Amostras: pBSK II (400 ng) incubado na presença de composto III 250 μM ; 0-40 minutos de incubação. L: pBSK II (200 ng) digerido com EcoRI. (B) Aumento da percentagem relativa da forma linear, determinada por análise densitométrica, como resultado do tempo de incubação. (C) Diminuição da mobilidade electroforética da forma superenrolada com o aumento do tempo de incubação. A análise densitométrica e a determinação da mobilidade relativa foram efectuadas por análise dos géis obtidos através do programa GelAnalyzer (www.gelalyzer.com). Os valores apresentados no gráfico correspondem à média de pelo menos 3 ensaios.

Contudo, tal como mencionado na secção 1.6, a interacção com os sulcos do DNA não implica o desencadeamento de alterações conformacionais na hélice dupla, contrariamente à intercalação, que envolve a formação de cavidades, de forma a acomodar o agente intercalante, que se traduzem num alongamento da estrutura de DNA (Chaires, 2006). Por este motivo, não será de esperar que um agente de interacção com sulcos cause diminuição da densidade super-helicoidal, como acontece com os intercalantes de DNA e como se verifica nos resultados obtidos. Sendo o complexo de cobalto estudado octaédrico, então os resultados sugerem que a substituição de uma fenantrolina por dois ligandos monodentados (um ião cloro e uma molécula de água) e/ou a presença de dois grupos cetona em cada uma das moléculas de fenantrolina constituam alterações estruturais suficientes para modificar a forma como o complexo interage com o DNA, uma vez que os complexos octaédricos de 1,10-fenantrolina, como $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, foram descritos por Barton (1986) como agentes de interacção com o sulco maior, enquanto o complexo $[\text{Co}(\text{DION})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$ aparenta ter capacidade intercalante.

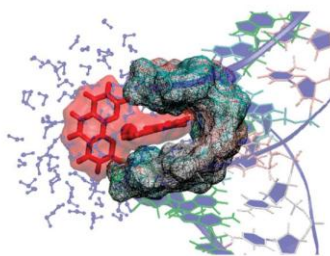


Figura 3.17 – Ajuste, por modelação molecular, de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ ao sulco menor de uma hélice dupla de DNA (Robertazzi *et al.*, 2009).

O facto do composto III originar uma disparidade ao nível da capacidade de intercalação nos ensaios de incubação a 24 h e incubação dependente do tempo poderá indicar que a intercalação faça parte do primeiro passo de um processo que culmina com a introdução de quebras em ambas as cadeias da hélice dupla. Isto é, o complexo poderá intercalar-se no DNA numa primeira fase e então catalisar a clivagem em ambas as cadeias. Neste caso, a intercalação só poderá ser detectada antes da introdução das quebras e poderá ser esse o motivo pelo qual não é detectada no ensaio com incubação de 24 h.

3.3.3. ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE POR AVALIAÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÓMICAS

Apesar do composto III evidenciar capacidade de clivagem de DNA por exposição directa não significa necessariamente que seja genotóxico em termos celulares, uma vez que poderá reagir com outras biomoléculas antes de atingir o núcleo, bem como sofrer difusão através da membrana mitocondrial, cujo potencial é negativo, e consequentemente acumular-se neste organelo, dada a carga positiva do composto (Modica-Napolitano e Aprille, 2001). Por outro lado, as quebras em cadeia dupla resultam no desenvolvimento de aberrações cromossómicas (Obe *et al.*, 2010), pelo que se o composto atingir o DNA e induzir quebras em cadeia dupla em número suficiente deverão observar-se então alterações na estrutura normal dos cromossomas. Por este motivo, estudou-se a genotoxicidade do composto III em culturas celulares de fibroblastos pulmonares de *Cricetulus griseus* (células V79) através

da pesquisa de aberrações cromossômicas em células em metáfase após exposição ao composto. A mitomicina C (MMC) foi utilizada como controlo positivo dada a sua capacidade de induzir aberrações cromossômicas (Oliveira *et al.*, 1997) como resultado da sua genotoxicidade, que advém da sua capacidade de formar monoaductos e ligações cruzadas no DNA (Dorr *et al.*, 1985). Para além disso, a mitomicina C é utilizada clinicamente há mais de 30 anos em quimioterapia aplicada ao tratamento de vários tumores sólidos (Sontakke e Fulzele, 2009), aumentando a sua aplicação clínica o interesse na sua utilização como composto de referência. A genotoxicidade do composto III foi avaliada a três concentrações diferentes (0,25 μM , 0,5 μM e 1,0 μM). Os resultados obtidos para a concentração mais baixa testada encontram-se representados na figura 3.18, em conjunto com os obtidos para a MMC.

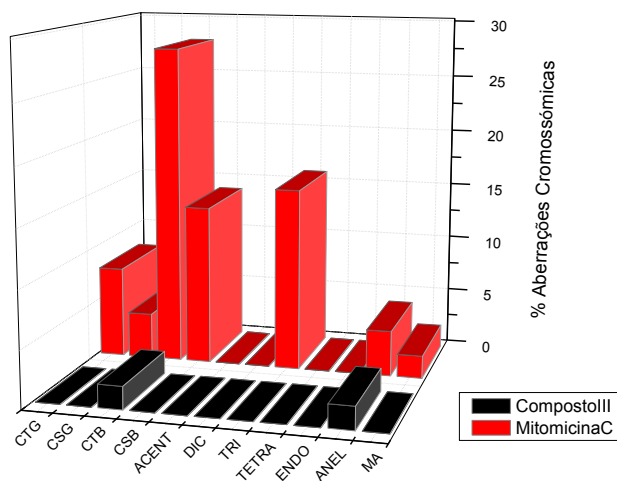


Figura 3.18 – Efeito do composto III (0,25 μM) na indução de aberrações cromossômicas (%) em células V79. MMC (1,5 μM) utilizada como composto genotóxico controlo. CTG, gap cromatídico; CSG, gap cromossômico; CTB, quebra cromatídica; CSB, quebra cromossômica; ACENT, fragmento acêntrico; DIC, cromossoma dicêntrico; TRI, rearranjo tri-radial; TETRA, rearranjo tetra-radial; ENDO, endoreduplicação; ANEL, cromossoma em anel; MA, células multi-aberrantes (com mais de 10 aberrações cromossômicas).

Como é possível observar por comparação com o efeito causado pela MMC, o composto III não se apresenta genotóxico, uma vez que apenas 4 % das células em metáfase observadas, incubadas na sua presença, apresentaram aberrações cromossômicas, nomeadamente quebras cromatídicas (2 %) e cromossomas em anel (2 %), por oposição aos 76 % contabilizados como resultado da exposição à MMC. As aberrações mais observadas por efeito da MMC foram as quebras cromatídicas e cromossômicas (28 e 14 %, respectivamente) e os arranjos tri-radiais (16).

Para as duas concentrações mais elevadas de composto III (0,5 e 1,0 μM) não foram observadas células em metáfase, o que sugere que o composto III deverá interferir na progressão do ciclo celular. Por este motivo, de forma a confirmar se de facto este composto tem capacidade de induzir a paragem do ciclo celular, bem como se o efeito é extensível aos restantes complexos organometálicos em estudo, poderá ser feita futuramente uma avaliação, por citometria de fluxo, da percentagem relativa das fases do ciclo celular em células incubadas na presença dos compostos.

3.4. AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO

Ghosh e colaboradores (2006) atribuíram a actividade de hidrólise de DNA pelo complexo $[\text{Co}(\text{DION})_2\text{Cl}_2]^+$ a espécies radicalares de oxigénio, originadas como consequência da foto-redução do Co(III) a Co(II), baseando-se no facto do composto induzir clivagem após foto-irradiação mas ser incapaz de gerar quebras no DNA quando as amostras são mantidas na ausência de luz. O composto III, apesar da grande analogia estrutural com este complexo deverá desencadear um mecanismo diferente, uma vez que os resultados de clivagem obtidos resultaram de incubações na ausência de luz, além do átomo de cobalto já se apresentar na sua forma reduzida, Co(II). No entanto, para tentar demonstrar se a clivagem do DNA, evidenciada pelos resultados dos ensaios anteriores, é dependente ou não da presença de espécies reactivas de oxigénio, realizou-se um ensaio de fluorescência no qual se utilizou a diclorohidrofluoresceína diacetato (DCHF-DA) como indicador fluorogénico, que permite detectar este tipo de moléculas. No interior das células, a DCHF-DA é desacetilada por esterases, dando origem à diclorohidrofluoresceína (DCHF) (não fluorescente), que na presença de espécies reactivas de oxigénio é oxidada, dando origem à diclorofluoresceína (DCF) (fluorescente) (Ubezio e Civoli, 1994). Foi utilizado como controlo positivo peróxido de hidrogénio (H_2O_2), cujo potencial de indução da oxidação de DCHF a DCF foi já reportada em *S. cerevisiae* por Madeo e colaboradores (1999). Foram realizados ensaios em tempos distintos de incubação na presença de H_2O_2 para identificar as melhores condições experimentais para posterior incubação das células de *S. cerevisiae* BY4741 na presença dos compostos II, III, IV e DION. Ao fim de duas horas de incubação com H_2O_2 as células observadas por microscopia de fluorescência apresentaram elevados níveis de fluorescência, facto que não se observou ao final de quatro horas de incubação (Figura 3.15).

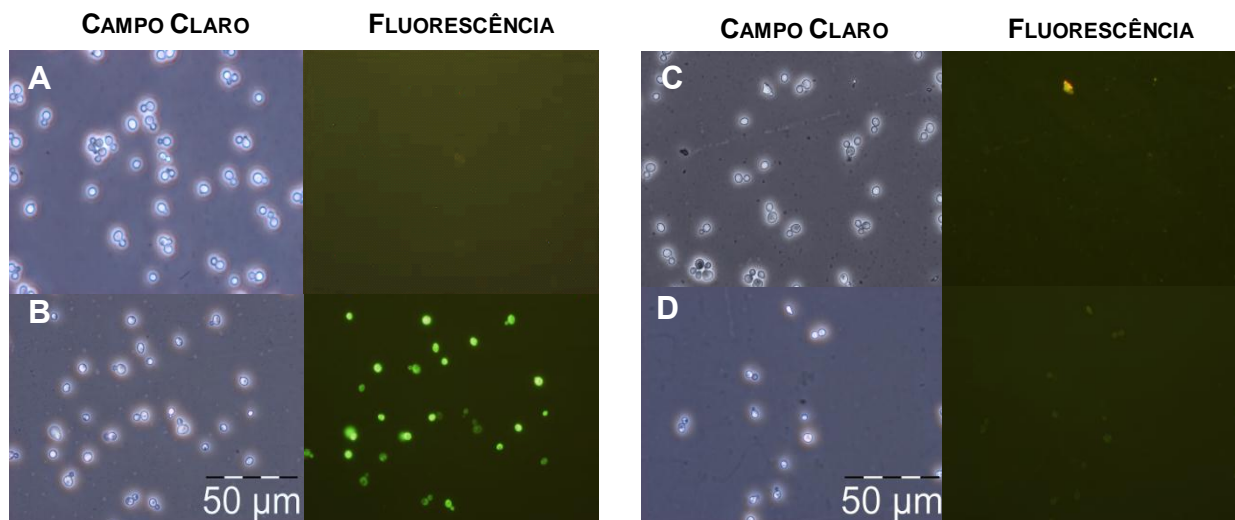


Figura 3.19 – Avaliação, por microscopia de fluorescência, da formação de espécies reactivas de oxigénio (conversão da diclorohidrofluoresceína em diclorofluoresceína fluorescente) por incubação de células de *S. cerevisiae* BY4741 durante 2 horas, em meio mínimo MMB pH 4,0 (controlo) (A) e na presença de 8,8 mM H_2O_2 (B), e durante 4 horas em meio mínimo MMB pH 4,0 (C) e na presença de a 8,8 mM H_2O_2 (D). (Ampliação de 400x)

Desta forma, procedeu-se à incubação das células com os compostos em estudo durante 2h, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 3.19.

A observação das células revelou a inexistência de fluorescência no controlo negativo, bem como nas células incubadas com os complexos organometálicos e com o DION (Figura 3.20). É importante referir também que, de acordo com Loetchutinat e colaboradores (2005), os iões Co^{2+} actuam como *quenchers* da fluorescência da DCF, existindo uma diminuição de cerca de 80% da fluorescência na presença de 20 mM de CoCl_2 (para 100 nM de DCHF-DA). No entanto, a concentração de complexo de cobalto testada é três ordens de grandeza inferior à referida por estes autores. Além disso, os espectros de absorção UV-visível dos compostos não revelam absorvância significativa na região de emissão da DCF, pelo que se espera que não haja qualquer interferência no ensaio por parte dos compostos. Portanto, o facto de não ter sido observada fluorescência nas células incubadas na presença dos compostos, quer de DION quer dos complexos organometálicos, indica que estes não deverão induzir a formação de espécies reactivas de oxigénio em *S. cerevisiae*.

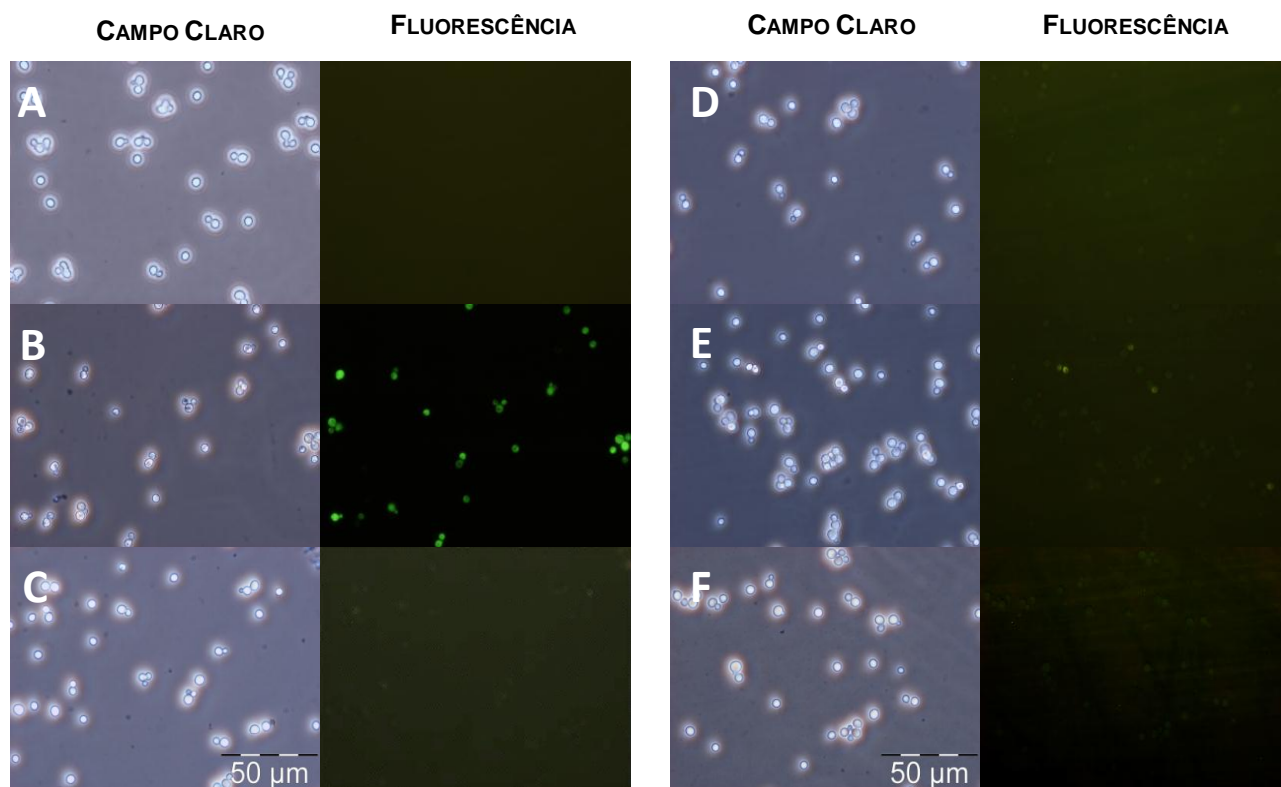


Figura 3.20 - Identificação da formação de espécies reactivas de oxigénio, por microscopia de fluorescência (oxidação de DCHF), após incubação de células de *S. cerevisiae* durante 2 horas na ausência de compostos (A), na presença de 8,8 mM de H_2O_2 (B), 20 μM de composto II (C), 20 μM de composto III (D), 30 μM de composto IV (E) e 30 μM de DION (F). (Ampliação de 400x)

Os resultados sugerem, portanto, que se existirem danos oxidativos causados por exposição aos compostos, como a oxidação de proteínas sugerida pelos resultados de proteómica, deverão resultar da acção directa destes. Por outro lado, se existir clivagem no DNA provocada pelo composto III em células

de *S. cerevisiae*, facto que contrariaria os resultados obtidos com as células V79 em que se verificou que o composto não é genotóxico, esta não deverá estar associada à produção de ROS.

Futuramente, para uma melhor compreensão do mecanismo de clivagem, poderão ser feitos estudos de re-ligação. Isto é, o plasmídeo linear resultante da reacção com o composto III é incubado com a enzima ligase T4 e verifica-se através de electroforese em gel de agarose se ocorreu re-ligação. Esta enzima apenas consegue re-ligar clivagens hidrolíticas, ou seja, clivagens independentes da formação de ROS. Por outras palavras, a permanência do plasmídeo na forma linear após incubação com a ligase indicaria que as quebras seriam introduzidas através de mecanismos oxidativos (Mancin e Tecilla, 2009).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

De entre os quatro complexos organometálicos inicialmente em estudo, verificou-se que apenas aqueles que apresentavam DION na sua coordenação, bem como o próprio DION, têm actividade significativa na redução da viabilidade das linhas tumorais HCT116 e HepG2. Apesar da marcação com *Hoechst* 33258 permitir detectar algumas características morfológicas tipicamente associadas à apoptose, como a compactação e fragmentação nucleares e a condensação da cromatina, especialmente nas células expostas ao DION, a avaliação da percentagem de células marcadas com FITC e iodeto de propídeo, por citometria de fluxo, sugere que tanto os complexos como o DION induzam morte celular por necrose. Futuramente deverá ser estudado o impacto sobre a viabilidade celular em células não neoplásicas de forma a avaliar se existe selectividade por parte dos compostos em estudo relativamente a células tumorais. Poderá também ser testado o efeito dos compostos em exposição conjunta com ácido desursoxicólico sobre o tipo de morte celular induzido, uma vez que existe descrição de que este ácido tem capacidade de favorecer a apoptose por conjugação com oxaliplatina que, por si própria, desencadeia necrose (Lim *et al.*, 2010). Desta forma seria possível tirar partido do potencial anti-tumoral destes compostos, orientando-o para a indução da apoptose e evitando que a sua presença possa resultar no desencadeamento de respostas inflamatórias, em organismos superiores.

Os complexos II, III e IV apresentaram um efeito citostático sobre o organismo eucariota modelo *S. cerevisiae*, induzindo uma fase de latência com uma duração até cerca de 45 h de incubação, tempo após o qual a levedura conseguiu contornar a sua presença e entrar em fase exponencial. A confirmação do efeito citostático será efectuada futuramente através da avaliação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição das células de levedura aos compostos. A análise das variações dos padrões de expressão proteica revelou a subexpressão de algumas enzimas envolvidas na glicólise/gluconeogénese (Fba1p, Tpi1p, Pgk1p, Gmp1p, Eno2p e Adh1p), bem como da pirofosfatase inorgânica Ipp1p, provocada pela presença dos compostos, indo de encontro à existência de um efeito citostático, como sugerido pela monitorização do crescimento. Poderá também estar a ocorrer interacção dos complexos com proteínas, dada a ocorrência de sobreexpressão de chaperonas, tanto citosólicas (Ssa1p, Ssa2p, Ssb1p e Ssb2p) como mitocondriais (Ssc1p), e de uma protease vacuolar (Pep4p). Além disso, observou-se, nas células recolhidas em fase exponencial de crescimento, sobreexpressão de uma proteína, Dsk2p, que poderá estar envolvida na degradação proteica por interacção com cadeias de poli-ubiquitina e com o proteossoma. O aumento dos níveis de chaperonas mitocondriais sugere que pelo menos em parte esteja a ocorrer internalização dos compostos na mitocôndria. Nas células em fase exponencial observou-se um aumento da expressão das proteínas glicolíticas face às células em latência, consistente com o facto de as células se encontrarem em crescimento e portanto metabolicamente activas. No entanto, foi observada também a sobreexpressão de proteínas de resposta a stress, tanto chaperonas (Ecm1p, Hsp60p, Ssa1p, Ssa2p, Ssb1p, Ssb2p e Ssz1p) como enzimas antioxidantes (Tsa1p e Sod1p), evidenciando que as células continuam com os mecanismos de resposta activos, apesar de se encontrarem em crescimento exponencial adaptado, e que poderá ocorrer formação de espécies reactivas de oxigénio como produtos secundários dos mecanismos de destoxificação.

O estudo espectrofotométrico da interacção dos complexos organometálicos com o DNA permitiu verificar que poderá ocorrer intercalação ou interacção com sulcos, devido à ocorrência de efeito

hipocrómico no espectro dos compostos após adição de concentrações crescentes de CT-DNA. Futuramente, poderá recorrer-se à viscosimetria para avaliar se os compostos provocam alongamento de oligómeros, como forma de distinguir entre ambas as formas de interacção. A espectrofotometria permitiu ainda determinar a afinidade dos compostos para o DNA, através do cálculo das constantes de ligação, cuja ordem será $III > II > IV$. Os valores obtidos relativamente aos complexos e à doxorubicina encontram-se todos na mesma ordem de grandeza, e dado o DNA encontrar-se na base do mecanismo de acção da doxorubicina (Hurley, 2002), os resultados sugerem que em termos de afinidade para os complexos organometálicos, o DNA poderá constituir um alvo dos mesmos. Além disso, o composto III apresentou-se capaz de introduzir quebras em cadeia dupla no DNA, linearizando o plasmídeo pBluescript II KS+ na forma superenrolada de forma directa, sem aumento da forma circular relaxada. Esta reacção demonstrou-se dependente da concentração de composto, pelo que sugere que este, ao introduzir a quebra no DNA fique impossibilitado de voltar a reagir, uma vez que nesse caso deveria existir conversão completa das formas superenrolada e circular relaxada na forma linear ao final de um longo período de exposição. A incubação com os compostos II e IV, por outro lado, não gerou variações significativas na distribuição das diferentes formas do pDNA. A incubação a diferentes tempos com o composto III resultou, por outro lado, num ligeiro retardamento da mobilidade electroforética e num aumento da percentagem relativa da forma linear dependentes do tempo de exposição do pDNA ao referido composto. Em conjunto, estes dados poderão sugerir que a sua interacção com o DNA inclua intercalação, seguida de clivagem em ambas as cadeias da dupla hélice, através de um mecanismo que resulta no estabelecimento de ligações covalentes entre o complexo e o DNA. A distinção entre a interacção com sulcos e a intercalação não é, no entanto, completamente clara, pelo que deverá ser alvo de investigação futura por aplicação de viscosimetria. O estabelecimento de ligações covalentes deverá também ser confirmado futuramente, de forma a validar o mecanismo proposto, uma vez que os ensaios efectuados não são específicos para avaliar a presença deste tipo de ligações.

O composto III não se mostrou, contudo, genotóxico em células V79, levando a concluir que a sua reactividade observada por exposição directa ao DNA poderá não ter um efeito significativo em termos celulares. Por este motivo, o composto em causa deverá interagir preferencialmente com outros componentes celulares, nomeadamente proteínas, tendo em conta os resultados de proteómica, ou sofrer acumulação mitocondrial, sendo assim impedido de atingir o núcleo. Além disso, não foram observadas células em metáfase, quando expostas a 0,5 e 1,0 μM de composto III, o que poderá indicar que este complexo organometálico induza uma paragem no ciclo celular, que deverá ser avaliada futuramente por citometria de fluxo.

A utilização de diclorohidrofluoresceína diacetato como indicador fluorogénico da presença de ROS permitiu verificar que os compostos não deverão estar envolvidos na sua formação, uma vez que não houve detecção significativa de fluorescência nas células de *S. cerevisiae*. Este resultado sugere que na ocorrência de oxidação de biomoléculas como resultado da exposição das células aos compostos esta se deva à acção directa destes e não à presença de espécies reactivas de oxigénio induzidas por eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics International*, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.
- Aguilera, A. e Gómez-González, B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics* 9:204-217.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. 2008. Cancer. In *Molecular Biology of The Cell*. 4^a ed., pp 1205-1268, Garland Science, New York.
- Aletras, V., Hadjiliadis, D. e Hadjiliadis, N. 1995. On the mechanism of action of the antitumor drug cis-platin (cis-DDP) and its second generation derivatives. *Metal Based Drugs* 2:153-185.
- Allardyce, C.S., Dyson, P.J., Ellis, D.J. e Heath, S.L. 2001. [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo-[3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells. *Chemical Communications* 15:1396-1397.
- Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Marques, B.S., Osório, N.S., Kollau, A., Mayer, B., Leão, C., Laranjinha, J., Rodrigues, F., Madeo, F. e Ludovico, P. 2007. NO-mediated apoptosis in yeast. *Journal of Cell Science* 120:3279-3288.
- Amaravadi, R.K. e Thompson, C.B. 2007. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* 13:7271-7279.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; 2010. <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>
- Avendaño, C. e Menéndez, J.C. 2008. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 1^a ed., Elsevier, Amsterdam.
- Atkins, J.H. e Gershell, L. J. 2002. Selective anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 1:491-492.
- Barton, J.K. e Lolis, E. 1985. Chiral Discrimination in the Covalent Binding of Bis(phenanthroline)dichlororuthenium(II) to B-DNA. *Journal of the American Chemical Society* 107:708-709.
- Barton, J.K. 1986. Metals and DNA: Molecular Left-Handed Complements. *Science* 233:727-734.
- Bales, B.C, Kodama, T., Weledji, Y.N., Pitié, M., Meunier, B. e Greenberg, M.M. 2005. Mechanistic studies on DNA damage by minor groove binding cooper-phenanthroline conjugates. *Nucleic Acids Research* 33:5371-5379.
- Berg, T. A. 2008. Iron Catalyzed Oxidation Chemistry from C-H bond Activation to DNA Cleavage. Tese de Doutorado. Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade de Groningen.
- Biggins, S., Ivanovska, I. e Rose, D. 1996. Yeast Ubiquitin-like Genes Are Involved in Duplication of the Microtubule Organizing Center. *The Journal of Cell Biology* 133:1331-1346.
- Bjornsti, M.A. 2002. Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell* 2:267-273
- Blackburn, G.M., Gait, M.J., Loakes, D. e Williams, D.M. 2006. Reversible Small Molecule-Nucleic Acid Interactions. In *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 3^a ed., pp 341-382, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Boorstein, W.R. Ziegelhoffer, T. e Craig E.A. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 38:1-17.
- Bosch, M. e Lowndes, N.F. 2004. Remodelling the Rad9 checkpoint complex: preparing Rad53 for action. *Cell Cycle* 3:119-122.

- Boschetti, G., Walter, T., Hervieu, V., Cassier, P., Lombard-Bohas, C., Adam, M., Scoazec, J.Y. e Dumortier, J. 2010. Complete response of hepatocellular carcinoma with systemic combination chemotherapy: not to get out the chemotherapy? *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22:1015-1018.
- Boulikas, T. 2008. Introduction to Anticancer Therapeutics. *In* Anticancer Therapeutics (S. Missailidis ed), 1^a ed., pp 50-54, Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Bozzone, D.M. 2007. The Biology of Cancer: Cancer Genetics, Chelsea House, New York.
- Braumann, F., Milisav, I., Neupert, W. e Herrmann, J.M. 2000. Ecm10, a novel Hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 487:307-312.
- Brown, I., Wallace, J.N.S. e Schofield, A. 2008. Antimicrotubules Agents. *In* Anticancer Therapeutics (S. Missailidis ed), 1^a ed., pp 79-89, Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Brunelle, J.K. e Zhang, B. 2010. Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug products. *Drug Resistance Updates* 13:172-179.
- Bukau, B. e Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperona machines. *Cell* 92:351-366
- Burkitt, M. J., Milne, L., Nicotera, P. e Orrenius, S. 1996. 1,10-Phenan-hroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat- liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions. *Biochemical Journal* 313:163–169.
- Cabiscol, E., Bellí, G., Tamarit, J., Echave, P., Herrero, E. e Ros, J. 2002. Mitochondrial Hsp60, Resistance to Oxidative Stress, and the Labile Iron Pool Are Closely Connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277:44531–44538.
- Carr-Schmid, A., Valente, L., Loik, V.I., Williams, T., Starita, L.M. e Kinzy, T.G. 1999. Mutations in Elongation Factor 1 β , a Guanine Nucleotide Exchange Factor, Enhance Translational Fidelity. *Molecular and Cellular Biology* 19:5257-5266.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S. e Moreira, P. I. 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry* 16:3267-3285
- Chaires, J.B. 2006. A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 453:26-31.
- Chao, H., Mei, W.J., Huang, Q.W. e Ji, L.N. 2002. DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asyemtric tridentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 92:165-170.
- Chen, C., and Dickman, M. B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102:3459– 3464.
- Cheng, X., Xu, Z., Wang, J., Zhai, Y., Lu, Y. e Liang, C. 2010. ATP-dependent pre-replicative complex assembly is facilitated by Adk1p in budding yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 285:29974-29980.
- Chow, A. Y. 2010. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education* 3(9):7
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. e Mantovani, A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh Hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30:1073-1081.
- Coyle, B., McCann, M., Kavanagh, K., Devereux, M. e Geraghty, M. 2003. Mode of antifungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. *BioMetals* 16:321–329.
- Coyle, B., Kinsella, P., McCann, M., Devereux, M., O'Connor, R., Clynes, M. e Kavanagh, K. 2004. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicology In Vitro* 18:63–70.

- Cutsem, E.V., Köhne, C.H., Hitre, E., Zaluski, J., Chien, C.R.C., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J.K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J. e Rougier, P. 2009. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 360:1408-1417.
- Danial, N.N. e Korsmeyer, S.J. 2004. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116:205-219.
- Deegan, C., Coyle, B., McCann, M., Devereux, M. e Egan, D.A. 2006. In vitro anti-tumor effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phenidione), $[\text{Cu}(\text{phenidione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ag}(\text{phenidione})_2]\text{ClO}_4$ using human epithelial cell lines. *Chemico-Biological Interactions* 164:115-125.
- Deegan, C., McCann, M., Devereux, M., Coyle, B. e Egan, D.A. 2007. In vitro cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{mal})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (malH_2 = malonic acid) using human cancer cells. *Cancer Letters* 247:224–233.
- Dive, C., Gregory, C.D., Phipps, D.J., Evans, D.L., Milner, A.E. e Wyllie, A.H. 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1133:275-285.
- Dixon, N.E. G., R.J., Lambert, J.N., Moghaddas, S., Pearce, D.A. e Sargeson, A.M. 1996. DNA Hydrolysis by stable metal complexes. *Chemical Communications* 11:1287-1288.
- Dixon, K. e Koprass, E. 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 14:441-448.
- Dorr R. T., Bowdan G. T., Alberts D. S. e Liddil J. D. 1985. Interactions of mitomycin C with mammalian DNA detected by alkaline elution. *Cancer Research* 45:3510-3516.
- Eisenman, H.C. e Craig, E.A. 2004. Activation of pleiotropic drug resistance by the J-protein and Hsp70-related proteins, Zuo1 and Ssz1. *Molecular Microbiology* 53:335-344.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35:495-516.
- Eriksson, M., Leijon, M., Hiort, C., Norden B. e Graeslund, A. 1992. Minor groove binding of $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ do $[\text{d}(\text{CGCGATCGCG})]_2$ evidenced by two-dimensional NMR. *Journal of the American Cancer Society* 114:4933-4934.
- Espinosa, E. e Raposo, C.G. 2010. Classification of Anticancer Drugs Based on Therapeutic Targets. *In Macromolecular Anticancer Therapeutics* (L.H. Reddy e P. Couvreur eds), 1^a ed., Springer, New York
- Fong, L.Y., Nguyen, V.T. e Farber, J.L. 2001. Esophageal Cancer Prevention in Zinc-Deficient Rats: Rapid Induction of Apoptosis by Replenishing Zinc. *Journal of the National Cancer Institute* 93:1525-1533.
- Franklin, R.B. e Costello, L. C. 2007. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 463:211-217.
- Franco, R., Schoneveld, O., Geogarkilas, A.G. e Panayiotidis, M.I. 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 266:6-11.
- Fridovich-Keil, J.L. 2005. Yeast as a Model for Human Diseases. *Wiley Encyclopedia of Life Sciences*. eLS
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T. e Kobayashi, H. 2002. Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:745-750.
- Gao, F., Chao, H., Wang, J.Q., Yuan, Y.X., Sun, B., Wei, Y.F., Peng, B. e Ji, L.N. 2007. Targeting topoisomerase II with chiral DNA-intercalating ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12:1015-1027.

- Gauthier, S., Couplier, F., Jourden, L., Merle, M., Beck, S., Konrad, M., Daignan-Fornier, B. e Pinson, B. 2008. Co-regulation of yeast purine and phosphate pathways in response to adenylic nucleotide variations. *Molecular Microbiology* 68: 1583–1594.
- Gibbs, P.N.B., Gore, M.G. e Jordan, P.M. 1985. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinate dehydratase. *Biochemical Journal* 225:573-850.
- Gilbert, C.S., van den Bosh, M., Green, C.M., Vialard, J.E., Grenon, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. e Lowndes, N.F. 2003. The budding yeast Rad9 checkpoint complex: chaperone proteins are required for its function. *European Molecular Biology Organization Reports* 4:953-958.
- Ghosh, S., Barve, A.C., Kumbhar, A.A., Kumbhar, A.S., Puranik, V.G., Datar, P.A., Sonawane, U.B. e Joshi, R.R. 2006. Synthesis, characterization, X-ray structure and DNA photocleavage by cis-dichloro bis(diimine) Co(III) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100:331-343.
- Glover, J.R. e Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94:73-82.
- Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnson, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. e Oliverr, S.G. 1996. Life with 6000 Genes. *Science* 274:546-567.
- Gottesman, M.M. 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine* 53:615-627.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. e Karin, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140:883–899.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. e Bartek, J. 2008. Na oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 319:1352-1355.
- Hallstrom, T.C., Katzmann, D.J., Torres, R.J., Sharp, W.J. e Moye-Rowley, W.S. 1998. Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 18:1147-1155.
- Hanahan, D. e Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D. e Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646-673.
- Hannon, M. J. 2007. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. *Pure and Applied Chemistry* 79:2243-2261.
- Hayashi, N. e Murakami, S. 2002. STM1, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein, interacts with CDC13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 267:806-813.
- Heffeter, P., Jungwirth, U., Jakupec, M., Hartinger, C., Galanski, M., Elbling, L., Micksche, M., Keppler, B. e Berger, W. 2008. Resistance against novel anticancer metal compounds: Differences and similarities. *Drug Resistance Updates* 11:1-16
- Heitman, J., Movva, N.R. e Hall, M.N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. e Sharma, R.A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 8:193-204.
- Hermann, T. e Patel, D.J. 1999. Stitching Together RNA Tertiary Architectures. 294:829-849.
- Higdon, J.V. e Ho, E. 2005. The Role of Zinc as a Metallotherapeutic Agent. *In Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine* (M. Gielen e E.R.T. Tiekink eds), 1a ed., pp 238-257, John Wiley and Sons, Chichester.

- Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schönfeld, H.J., Schatz, G. e Azem A. 1997. Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *European Molecular Biology Organization Journal* 16:1842-1849.
- Hurley, L.H. 2002. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2:188-200.
- Igney, F.H. e Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2:277-288.
- International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2008, World Health Organization. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=994> (Acedido a 16 de Maio de 2011)
- Jordan, M.A. e Wilson, L. 2004. Microtubules as targets for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* 4:253-265.
- Jungwirth, H. e Kuchler, K. 2006. Yeast ABC transporters – A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Letters* 580:1131-1138.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. e Pfanner, N. 1990. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348:137-143.
- Kartalou, M. e Essigmann, J.M. 2001. Mechanism of resistance to cisplatin. *Mutation Research* 478:23-43.
- Kaufman, B.A., Kolesar, J.E., Perlman, P.S. e Butow, R.A. 2003. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 163:457-461.
- Keck, M.V. e Lippard, S.J. 1992. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* 114:3386-3390.
- Keene, F.R., Smith, J.A. e Collins, J.G. 2009. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. *Coordination Chemistry Reviews* 253:2021-2035.
- Kelland, L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7:573-584.
- Kelly, J.M., Tossi, A.B., McConnell, D.J. e OhUigin, C. 1985. A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Research* 13:6017-6034.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. e Currie, A.R. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239-257.
- Kondo, N., Takahashi, A. e Ohnishi, T. 2010. DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. *Journal of Nucleic Acids* 2010:1-7
- Larsen, A.K., Escargueil, A.E. e Skladanowski, A. 2003. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 99:167-181.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. e Toledano, M.B. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 274:16040-16046.
- Lenglet, G. e David-Cordonnier, M.H. 2010. DNA-Destabilizing Agents as an Alternative Approach for Targeting DNA: Mechanisms of Action and Cellular Consequences. *Journal of Nucleic Acids* 2010:1-17.
- Lengronne, A., Schwob, E. 2002. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G1. *Molecular Cell* 9:1067-1078.
- Lewin, B. 2004. *Oncogenes and Cancer. In Genes*, 8^a ed., pp 889-937, Pearson Prentice Hall, Saddle

River.

- Liaw, K.Y., Lee, P.H., Wu F.C., Tsai, J.S. e Lin-Shiau, S.Y. 1997. Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma. *American Journal of Gastroenterology* 92:2260-2263.
- Lim, S.C., Choi, J.E., Kang, H.S. e Han, S.I. 2010. Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 126:1582-1595.
- Liu, X.D., Morano, K.A. e Thiele, D.J. 1999. The Yeast Hsp110 Family Member, Sse1, Is an Hsp90 Cochaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 274:26654-26660.
- Liu, F.S. 2009. Mechanims of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy – A Quick Review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 48:239-244.
- Llovet, J.M. e Bruix, J. 2008. Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 48:1312-1327.
- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.F., Oliveira, A.C.O., Santoro, A., Raoul, J.L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T.F., Galle, P.R., Seitz, J.F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D. e Bruix, J. 2008. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 359:378-390.
- Lobo, I. 2008. Multifactorial inheritance and genetic disease. *Nature Education* 1:1
- Lockshin, R.A. e Williams, C.M. 1965. Programmed cell death – I Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. *Journal of Insect Physiology* 11:123–133.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J.P. e Mankhetkorn, S. 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry* 72:323-331.
- Lowe, S.W. e Lin, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21:485-495.
- Lundin, M., Baltscheffsky, H. e Ronne, H. 1991. Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function *Journal of Biological Chemistry* 266:12168-12172.
- Luqmani, Y.A. 2005. Mechanisms of drug resistance in drug chemotherapy. *Medical principles and Practice* 14(Suppl.1):35-48.
- Lustig, A.J. 2001. Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions. *Nature Structural Biology* 8:297-299.
- Macierzanka, M., Plotka, M., Drobinska, D.P., Lewandowska, A., Lightowlers, R. e Marszalek, J. 2008. Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783:107-117.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. e Fröhlich K.U. 1999. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *The Journal of Cell Biology* 145:757-767.
- Mancin, F. e Tecilla, Paolo. 2009. Artificial Restriction Agents: Hydrolytic Agents for DNA Cleavage. *In Metal Complex-DNA Interactions* (N. Hadjiliadis e E. Sletten eds), 1a ed., pp 269-394, Wiley, Chichester.
- Manov, I., Pollak, Y., Broneshter, R. e Iancu, T.C. 2011. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib – the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction. *FEBS Journal* 278:3494-3507.
- Mantovani, A. 2009. Inflaming Mestastasis. *Nature* 457:36-37.
- Marie, S. K. e S. M. Shinjo. 2011. Metabolism and brain cancer. *Clinics* 66:33-43.

- Marques, M., Mojzita, D., Amorim, M.A., Almeida, T., Hohmann, S., Moradas-Ferreira, P. e Costa, Victor. 2006. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 152:3595-3605.
- Marrero, J.A., Fontana, R.J., Barrat, A., Askari, F., Conjeevaram, H.S., Su, G.L. e Lok, A.S. 2005. Prognosis of Hepatocellular Carcinoma: Comparison of 7 Staging Systems in an American Cohort. *Hepatology* 41:707-716.
- Mason, D.A., Shulga, N., Undavai, S., Ferrando-May, E., Rexach, M.F. e Goldfarb, D.S. 2005. Increased nuclear envelope permeability and Pep4p-dependent degradation of nucleoporins during hydrogen peroxide-induced cell death. *FEMS Yeast Research* 5:1237-1251.
- McAlister, L. e Holland, M.J. 1982. Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *Journal of Biological Chemistry* 257:7181-7188.
- McCann, M., Geraghty, M., Devereux, M., O'Shea, D., Mason, J. e O'Sullivan, L. 2000. Insights into the mode of action of the anti-Candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates, *Metal-Based Drugs* 7:185-193.
- McCann, M., Coyle, B., McKay, S., McCormack, P., Kavanagh, K., Devereux, M., McKee, V., Kinsella, P., O'Connor, R. e Clynes, M. 2004. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phenidio)₂]ClO₄ (phenidio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. *Biometals* 17:635-645
- McCall, K.A., Huang, C.C. e Fierke, C.A. 2000. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *Journal of Nutrition* 130:1437S-1446S.
- McClendon, A.K. e Osheroff, N. 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation Research* 623:83-97.
- Meggers, E. 2009. Targeting proteins with metal complexes. *Chemical Communications* 9:1001-1010
- Modica-Napolitano, J.S. e Aprille, J.R. 2001. Delocalized lipophilic cations selectively Target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 49:63-70.
- Mokranjac, D. e Neupert, W. 2009. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793:33-41.
- Murugkar, A., Padhye, S., Guha-Roy, S. e Wagh, U. 1999. Metal complexes of Taxol precursor: 1. Synthesis, characterization and antitumor activity of the copper complex of 10-deacetylbaccatin thiosemicarbazone. *Inorganic Chemistry Communications* 2:545-548.
- Nakamoto, K., Tsuboi, M. e Strahan, G.D. 2008. *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*, 1^a ed., Wiley, New Jersey.
- National Institute of Cancer, *Chemotherapy and You: Support for People With Cancer*. Version 29 June 2007. <http://www.cancer.gov/cancertopics/coping/chemotherapy-and-you/> (Acedido a 15 de Abril de 2011).
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G. e Halazonetis, T. 2010. Genomic instability – na evolving Hallmark of cancer. *Nature* 11: 220-228.
- Neidle, S. 1979. The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs. *Progress in Medicinal Chemistry* 16:151-221.
- Neidle, S. 2001. DNA minor-groove recognition by small molecules. *Natural Product Reports* 18:291-309.

- Ni, Y., Lin, D. e Kokot, S. 2006. Synchronous fluorescence, UV–visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Analytical Biochemistry* 352:231-242.
- Nishimoto, A., Miura, N., Horikawa, I., Kugoh, H., Murakami, Y., Hirohashi, S., Kawasaki, H., Gazdar, A.F., Shay, J.W., Barrett, J.C. e Oshimura, M. 2001. Functional evidence for a telomerase repressor gene on a human chromosome 10p15.1. *Oncogene* 20:828-835.
- Obe, G. Johannes, C. e Ritter, S. 2010. The number and not the molecular structure of DNA double-strand breaks is more importante for the formation of chromosomal aberrations: A hypothesis. *Mutation Research* 701:3-11.
- Oberhammer, F., Fritsch, G., Schmied, M., Pavelka, M., Printz, D., Purchio, T., Lassmann, H. e Hermann, R.S. 1993. Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *Journal of Cell Science* 104:317-326.
- Okuruma, K., Huang, S. e Sinicrope, F.A. 2008. Induction of Noxa Sensitizes Human Colorectal Cancer Cells Expressing Mcl-1 to the Small-Molecule Bcl-2/Bcl-xL Inhibitor, ABT-737. *Clinical Cancer Research* 14:8132-8142.
- Oliveira, N.G., Rodrigues, A.S., Chaveca, T. e Rueff, J. 1997. Induction of an adaptative response to quercetin, mitomycin C and hydrogen peroxide by low doses of quercetin in V79 Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 12:457-462.
- Oliver, S.G. 2002. Functional genomics: lessons from yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357:17-23.
- Otero, L., Smircich, P., Vieites, M., Ciganda, M., Severino, P.C., Terenzi, H., Cerecetto, H., Gambino, D. e Garat B. 2007. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101:74-79.
- Parr, C.L., Keates, R.A.B., Bryksa, B.C., Ogawa, M. e Yada, R.Y. 2007. The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* 24:467-480.
- Paz, M.M. 2008. Antitumour Antibiotics. *In* *Anticancer Therapeutics* (S. Missailidis ed), 1a ed., pp 111-131, Wiley-Blackwell, Chichester.
- Petit, A., Mwale, F., Zukor, D.J., Catelas, I., Antoniou, J. e Huk, O.L. 2004 Effect of cobalt and chromium ions on bcl-2, bax, caspase-3, and caspase-8 expression in human U937 macrophages. *Biomaterials* 25:2013-2018.
- Plumbridge, T.W. e Brown, J.R. 1977. Spectrophotometric and fluorescence polarization studies of the binding of ethidium, daunomycin and mepacrine to DNA and to poly(I · C). *Biochimica et Biophysica Acta* 479:441-449.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y. e van Dijken, J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1607-1633.
- Pucéat, M., Travo, P., Quinn, M.T. e Fort, P. 2003. A Dual Role of the GTPase Rac in Cardiac Differentiation of Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 14:2781-2792.
- Ramakrishnan, S., Suresh, E., Riyasdeen, A., Akbarsha, M.A. e Palaniandavar, M. 2011. Interaction of $rac-[M(diimine)_3]^{2+}$ (M = Co, Ni) complexes with CT DNA:role of 5,6-dmp ligand on DNA binding and cleavage and cytotoxicity. *Dalton Transactions* 40:3245-3256.
- Reddy, P.R. e Shilpa, A. 2011. Oxidative and hydrolytic DNA cleavage by Cu(II) complexes of salicylidene tyrosine schiff base and 1,10 phenanthroline/bipyridine. *Polyhedron* 30:565-572.
- Reedijk, J. e Lohman, P.H.M. 1985. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action.

Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition 7:173-180.

- Reedijk, J. 1987. The mechanism of action of platinum anti-tumor drugs. *Pure and Applied Chemistry* 59:181-192.
- Reisner, E., Arion, V.B., Keppler, B.K. e Pombeiro. 2008. Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. *Inorganica Chimica Acta* 361:1569-1583.
- Robertazzi, A., Vargiu, A.V., Magistrato, A., Ruggerone, P., Carloni, P., Hoog, P. e Reedijk, J. 2009. Copper-1,10-Phenanthroline Complexes Binding to DNA: Structural Predictions from Molecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* 113:10881-10890.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R.A. e Pimentel, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast* 27:245-258.
- Rohs, R., Sklenar, H., Lavery, R. e Roder, B. 2000. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *Journal of American Chemical Society* 122:2860-2866.
- Ruddon, R.W. 2007. *Cancer Biology*, 4^a ed., Oxford University Press, New York.
- Santos, P.M., Simões, T. e Sá-Correia, I. 2009. Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: A toxicoproteomics approach. *Proteomics* 9:657-670.
- Satyanarayana, S., Dabrowiak, J.C. e Chaires, J.B. 1992. Neither Δ - nor Λ -Tris(phenanthroline)ruthenium(II) Binds to DNA by Classical Intercalation. *Biochemistry* 31:9319-9324.
- Sawai, H. e Domae, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441:569-573.
- Schreiber, S.L. e Crabtree, G.R. 1992. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today* 13:136-142.
- Schroeder, G.K., Lad, C., Wyman, P., Williams, N.H. e Wolfenden. 2006. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4052-4055.
- Scolaro, C., Chaplin, A.B., Hartinger, C.G., Bergamo, A., Cocchietto, M., Keppler, B.K., Sava, G. e Dyson, P.J. 2007. Tuning the hydrophobicity of ruthenium(II)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy. *Dalton Transactions* 44:5065-5072.
- Sigman, D.S., Mazumder, A. e Perrin, D.M. 1993. Chemical Nucleases. *Chemical Reviews* 93:2295-2316.
- Sontakke, Y.A. e Fulzele, R.R. 2009. Cytogenetic study on genotoxicity of antitumor-antibiotic Mitomycin C. *Biomedical Research* 20:40-44.
- Surveillance Epidemiology and End Results, National Institute of Cancer, 2008. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/browse_csr.php?section=2&page=sect_02_table.07.html (Acedido a 29 de Abril de 2011).
- Tan, X.W., Xia, H., Xu, J.H. e Cao, J.G. 2009. Induction of apoptosis in human liver carcinoma HepG2 cell line by 5-allyl-7-gen-difluoromethylenechrysin. *World Journal of Gastroenterology* 15:2234-2239.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. e Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:231-241.
- Teixeira, M.C., Santo, P.M., Fernandes, A.R. e Sá-Correia, I. 2005. A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Proteomics* 5:1889-1901.
- Teng, M., Usman, N., Fredrick, C.A. e Wang, H.J. 1998. The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). *Nucleic Acids Research* 16:2671-2690

- Thederahn, T.B., Kuwaraba, M.D., Larsen, T.A. e Sigman D.S. 1989. Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline-Copper: Kinetic Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 111:4941-4946.
- Theophanides, T., Anastassopoulou, J. e Demunno, G. 2003. Metal-DNA Interactions. *In Metal-Ligand Interactions: Molecular, Nano-, Micro, and Macro-systems in Complex-Environments* (N. Russo, D. R. Salahub e M. Witko eds) 1^a ed., pp.285-300, NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry, Dordrecht.
- Troitskaya, Z.O., Perlman, P.S. e Butow, R.A. 1995. An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *European Molecular Biology Organization Journal* 14:3268-3276.
- Trotter, E.W., Rand, J.D., Vickerstaff, J. e Grant, C.M. 2008. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *The Biochemical Journal* 412:73-80.
- Tsang, S.Y., Tam, S.C., Bremner, I. e Burkitt, M.J. 1996. Copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical. *Biochemical Journal* 317:13-16.
- Ubezio, P. e Civoli, F. 1994. Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 16:509-516.
- Van Dyke, N., Pickering, B.F. e Van Dyke, M.W. 2009. Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation. *Nucleic Acids Research* 37:6116-6125.
- Vergara, E., Casini, A., Sorrentino, F., Zava, O., Cerrada, E., Rigobello, M.P., Bindoli, A., Laguna, M. e Dyson, P.J. 2010. *ChemMedChem* 5:96-102.
- Vermes, I., Haanen, C., Nakken, H.S. e Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184:39-51.
- Vogelstein, B. e Kinzler, K. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10:789-799.
- Walker, G.M. 2004. Yeasts. *In The Desk Encyclopedia of Microbiology* (M. Schaechter ed). 1a ed., pp.1102-1114, Elsevier, San Diego.
- Wang, B.D.W., Yang, Z.Y., Quin, D.D. e Chen, Z.N. 2007. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the Ln(III) complexes with ethylenediiminobi(6-hydroxychromone-3-carbaldehyde) Schiff-base. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 194:49-58.
- Wang, H.F., Shen, R. e Tang, N. 2009. Synthesis and characterization of the Zn(II) and Cu(II) piperidinyl isoeuxanthone complexes: DNA-binding and cytotoxic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44:4509-4515.
- Weinberg, R.A. 2008. Cancer: A Genetic Disorder. *In The Molecular Basis of Cancer* (J.M Mendelsohn, P.M. Howley, M.A. Israel, J.W. Gray e G.B. Thompson eds), 3^a ed., pp 3-16, Saunders, Philadelphia.
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E. e Craig A.E. 1987. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 7:2568-2577.
- Williams, N.H., Takasaki, B., Wall, M. e Chin, J. 1999. Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions. *Accounts of Chemical Research* 32:485-493.
- Woo, R.A. e Poon, R.Y. 2004. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes & Development* 18:1317-1330.

- World Health Organization. Cancer Fact Sheet N°297. Version February 2011.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Acedido a 16 de Maio de 2011)
- Xu, Q., Shoemaker, R.K. e Braunlin, W.H. 1993. Induction of A-B Transitions of Deoxynucleotides by Multivalent Cations in Dilute Aqueous Solution. *Biophysical Journal* 65:1039-1049.
- Xu, Q., Jampani, S.R.B., Deng, H. e Braunlin, W.H. 1995. Quiral Recognition of Deoxyoligonucleotides by Δ - and Λ -Tris(ethylenediamine)cobalt(III). *Biochemistry* 34:14059-14065.
- Yamamoto, K.N., Kobayashi, S., Tsuda, M., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda e S., Hirota, K. 2011. Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:6492-6496.
- Yuan, D.S. 2000. Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by transposon tagging. *Genetics* 156:45-58.
- Yuan, C.X., Wei, Y.B. e Yang, P. 2006. DNA-Binding and Cleavage Studies of Zinc(II) Mixed-polypyridyl Complex. *Chinese Journal of Chemistry* 24:1006-1012.
- Zelis, B.M., Pierre, V.C. e Barton, J.K. 2007. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications* 44:4549-4696.
- Zelko, I.G., Mariani, T.J. e Folz, R.J. 2002. Superoxide Dismutase Multigene Family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33:337-34.
- Zhang, C.X. e Lippard, S.J. 2003. New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 7:481-489.
- Zhang, B., Qian, D., Ma, H.H., Jin, R., Yang, P.X., Cai, M.Y., Liu, L.H., Liao, Y.J., Deng, H.X., Mai, S.J., Zhang, H., Zeng, Y.X., Lin, M.C., Kung, H.F., Xie, D. e Huang, J.J. 2011. Anthracyclines disrupt telomere maintenance by telomerase through inducing PinX1 ubiquitination and degradation. *Oncogene* (doi:10.1038/onc.2011.214)
- Zhou, H., Lui, Y., Zhen, C., Gong, J., Liang, Y., Wang, C. e Zou, G. 2003. Microcalorimetric studies of the synergistic effects of copper-1,10-phenanthroline combined with hyperthermia on a liver hepatoma cell line Bel-7402. *Termochimica Acta* 397:87-95.